



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**“Efecto de la pirrolidina ditiocarbamato sobre la  
proliferación de células mononucleares de sangre  
periférica aisladas de pacientes con paraparesia  
espástica tropical”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Ricardo Jean Pierre MERINO ROJAS**

**ASESOR**

**Dr. Dan Erick VIVAS RUIZ**

**PhD. Michael John TALLEDO ALBÚJAR**

**Lima, Perú**

**2019**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Merino, R. (2019). *Efecto de la pirrolidina ditiocarbamato sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes con paraparesia espástica tropical*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado  
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

## **Hoja de metadatos complementarios**

Código ORCID del autor (dato opcional):

0000-0003-0100-9464

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0003-4417-2026

DNI del autor:

70837974

Grupo de investigación:

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

FONDECYT

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres 15102

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2017 – 2019



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 13:10 horas del 18 de noviembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **RICARDO JEAN PIERRE MERINO ROJAS**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 013-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **"EFECTO DE LA PIRROLIDINA DITIOCARBAMATO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA AISLADAS DE PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **RICARDO JEAN PIERRE MERINO ROJAS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 14:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 18 de noviembre de 2019.

Mg. PATRICIA WOLL TOSO  
(PRESIDENTA)

Dr. DAN VIVAS RUIZ  
(ASESOR)

Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES  
(MIEMBRO)

Blg. VIDALINA HEREDIA JIMENEZ  
(MIEMBRO)

## DEDICATORIA

*A las personas que más admiro en el mundo,  
mi padre Ricardo y mi madre Beatriz,  
por el gran ejemplo que son para mí,  
por su enorme fortaleza,  
por su apoyo incondicional y  
por todo el amor que me brindan.*

*A mis grandes amigos de toda la vida,  
Geraldine y Aldhair, mis hermanos.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, de manera especial a mis padres Ricardo y Beatriz, porque siempre me han demostrado que, a pesar de los múltiples inconvenientes que la vida me presente, puedo contar con ellos, recibir sus consejos y su invaluable apoyo. A mi hermana Geraldine, en quien he podido comprender el significado de amistad incondicional, y a mi hermanito Aldhair por todos los momentos de alegría y aprendizaje que hemos compartido.

Al PhD. Michael Talledo por darme la oportunidad de realizar la tesis bajo su asesoría y por haberme permitido formar parte del Grupo de Investigación en Virología, donde he podido tener un gran crecimiento intelectual y personal. Al mismo tiempo, a Giovanni López quien, con sus aportes, fue un buen guía durante gran parte del desarrollo de este trabajo.

Al proyecto titulado “Modulación de la vía de NFkB en células de pacientes infectados por HTLV-1 como blanco para el tratamiento de paraparesia espástica tropical” (Contrato de Subvención 119-2016-FONDECYT) por el financiamiento que permitió el desarrollo y culminación de esta investigación.



A mi asesor interno, Dr. Dan Vivas Ruiz, por su colaboración y por todos los consejos y recomendaciones que me ha brindado.

A todos los miembros del Grupo de Investigación en Virología, quienes me apoyaron desde el principio y me hicieron sentir como en casa cuando ingrese al laboratorio. A mis compañeros de laboratorio, Dylan, Xiomara, Gabriela, Maryam y Andrés, por su ayuda y todas las facilidades que me brindaron.

A Natylla por su paciencia y apoyo incondicional en cada momento.

Finalmente, expreso mi sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que, estando involucradas o no, hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación.

## **ABREVIATURAS**

CFSE: Éster de succinimidil carboxifluoresceína

DMSO: Dimetilsulfóxido

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

HAM/TSP o PET: Paraparesia espástica tropical

HLA: Sistema del antígeno leucocitario humano

HTLV-1: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1

LC<sub>50</sub>: Concentración letal media

LTR: Repetición terminal larga

OD: Densidad óptica

OMS: Organización Mundial de Salud

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PDTC: Pirrolidina ditiocarbamato

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

TB: Tuberculosis



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
1. HTLV-1: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 .....	4
a. El virus .....	4
b. La proteína Tax .....	6
c. Transmisión .....	7
d. Epidemiología.....	8
e. Enfermedades asociadas .....	10
2. HAM/TSP o PET: Paraparesia Espástica Tropical .....	12
a. La enfermedad .....	12
b. Factores de riesgo .....	14
c. Diagnóstico .....	16
d. Patogénesis .....	18
3. NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas .....	20
a. La vía celular NF- $\kappa$ B .....	20
b. La proteína I $\kappa$ B $\alpha$ : inhibidor de la activación de la vía NF- $\kappa$ B en la ruta canónica .....	21
c. Genes asociados a la vía NF- $\kappa$ B .....	22
d. La vía NF- $\kappa$ B en la paraparesia espástica tropical .....	23
4. PDTC: Pirrolidina Ditiocarbamato .....	26
a. PDTC .....	26
b. PDTC y la vía NF- $\kappa$ B .....	27
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	29
1. HIPÓTESIS .....	29
2. OBJETIVOS .....	29
a. Objetivo General .....	29
b. Objetivos Específicos .....	29
IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	30
1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	30
a. POBLACIÓN{ .....	30

b.	MUESTREO .....	31
c.	MUESTRA .....	33
2.	MÉTODOS .....	34
a.	AISLAMIENTO DE LAS PBMC .....	34
b.	CULTIVOS CELULARES .....	35
c.	CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC <sub>50</sub> ) .....	36
d.	ESTIMACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR .....	36
e.	MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CITOQUINA IFN- $\gamma$ .....	38
f.	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF-KB .....	40
3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
V.	RESULTADOS .....	44
1.	CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LA PDTC .....	44
2.	PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS PBMC TRATADAS CON PDTC .....	46
3.	NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA CITOQUINA INF- $\gamma$ EN PBMC TRATADAS CON PDTC.....	47
4.	ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF- $\kappa$ B .....	49
a.	Activación de la vía NF- $\kappa$ B por translocación de RelA al núcleo .....	49
b.	Cuantificación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ fosforilada .....	50
VI.	DISCUSIÓN .....	52
VII.	CONCLUSIONES .....	58
VIII.	RECOMENDACIONES .....	59
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
X.	ANEXOS .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis y resultados del cálculo de la concentración letal media ( $LC_{50}$ )	50
Tabla 2.	Formulación medio RPMI 1640 incompleto	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura y genoma de HTLV-1	5
Figura 2.	Resumen de las interacciones de Tax de HTLV-1 con las proteínas de señalización celular de la célula hospedera	7
Figura 3.	Mapa de la distribución geográfica de los principales focos de la infección por HTLV-1	10
Figura 4.	Imagen por resonancia magnética de una médula espinal atrofiada en un paciente con PET	13
Figura 5.	Criterios de diagnóstico para la Paraparesia Espástica Tropical establecido por la OMS	17
Figura 6.	Esquema de la activación de la vía NF-KB a través de la vía canónica	21
Figura 7.	Modelo de la activación de las vías canónica y no canónica de NF-κB mediada por Tax.	25
Figura 8.	Estructura de la pirrolidina ditiocarbamato (PDTC)	26
Figura 9.	Flujo de la muestra para el estudio	32
Figura 10.	Esquema de la gradiente de densidad generada por el Ficoll después de una centrifugación	35
Figura 11.	Análisis por citometría de flujo de la proliferación celular con CFSE	38
Figura 12.	Gráfico dosis respuesta de PBMC	46
Figura 13.	Análisis de proliferación celular mediante citometría usando CFSE	47
Figura 14.	Análisis de la expresión de la citoquina IFN-γ	49
Figura 15.	Porcentaje de activación de la vía NF-κB	50
Figura 16.	Cuantificación de la proteína IκBα fosforilada	51
Figura 17.	<i>Brochure</i> del kit de CFSE utilizado para la estimación de proliferación celular	80
Figura 18.	<i>Brochure</i> del kit de CFSE utilizado para la estimación de proliferación celular	81
Figura 19.	Resumen del procedimiento de fraccionamiento celular realizado con el kit PARIS	86
Figura 20.	Resumen esquemático del procedimiento utilizado para la medición de la proteína RelA en la fracción nuclear utilizando el kit TransAM® NFκB Family (Active Motif®)	87
Figura 21.	Flujograma esquemático del procedimiento para la medición de la proteína IκBα utilizando el kit IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen)	88
Figura 22.	Flujograma esquemático del procedimiento para la medición de la proteína IκBα utilizando el kit IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen)	89

## RESUMEN

La paraparesia espástica tropical (PET) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva asociada a la infección con HTLV-1. Se estima que alrededor del 5% de personas infectadas con el virus podrían desarrollar PET, lo cual implica afecciones en los miembros inferiores como dolores lumbares, padecimientos urinarios y problemas en el caminar, así como la posterior postración del individuo. Pese a que esta enfermedad ha sido descrita y estudiada hace varias décadas aún no se conocen de manera precisa los factores que la desencadenan, mucho menos existe un tratamiento estandarizado para los pacientes que sufren este padecimiento. En este estudio se evaluó los efectos *in vitro* del antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con PET. Se encontró que la PDTC es capaz de reducir la proliferación celular de las PBMC infectadas, así como también disminuye la expresión de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$ . Ambos efectos se encuentran asociados a la activación exacerbada de la vía NF- $\kappa$ B que ocurre en las células de pacientes con PET, por lo que también se evaluó el efecto de la PDTC sobre la activación de esta vía. Se observó que el tratamiento con el antioxidante redujo de manera significativa la activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por la proteína RelA. En ese sentido, se ha podido comprobar que el antioxidante PDTC muestra efectos antiproliferativos y antiinflamatorios sobre las PBMC de pacientes con paraparesia espástica tropical, lo que podría implicar su posible uso como agente terapéutico para esta enfermedad, aunque se remarca la necesidad de realizar mayores estudios.

## ABSTRACT

HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) is a progressive neurodegenerative disease associated with infection with HTLV-1. It is estimated that around 5% of people infected with the virus could develop HAM/TSP, which involves conditions in the lower limbs such as lower back pain, urinary conditions and walking problems, as well as the subsequent prostration of the individual. Although this disease has been described and studied several decades ago, they still do not know precisely the factors that trigger it, much less there is not a standardized treatment for patients suffering this condition. In this study, the *in vitro* effects of the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with PET were evaluated. It was found that PDTC is capable of reducing the cellular proliferation of infected PBMCs, as well as decreasing the expression of the proinflammatory cytokine IFN- $\gamma$ . Both effects are associated with the exacerbated activation of the NF- $\kappa$ B pathway that occurs in the cells of patients with HAM/TSP, so the effect of PDTC on the activation of this pathway was also evaluated. It was observed that the treatment with the antioxidant significantly reduced the activation of the NF- $\kappa$ B pathway mediated by the RelA protein. In that sense, it has been possible to verify that the antioxidant PDTC shows anti-proliferative and anti-inflammatory effects on PBMC of patients with HAM/TSP, which could imply its possible use as a therapeutic agent for this disease, although the need for further studies is highlighted.

## I. INTRODUCCIÓN

El virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1, por sus siglas en inglés) fue el primer retrovirus humano identificado (Poiesz *et al.*, 1980). Se estima que alrededor de 5 a 10 millones de personas se encuentran infectadas con este virus a nivel mundial (Gessain & Cassar, 2012), con mayor prevalencia en lugares como Japón, Melanesia, Irán, África central y occidental, el Caribe y Sudamérica (Proietti *et al.*, 2005). En el Perú se ha reportado una frecuencia de infectados con HTLV-1 que triplica la cantidad de individuos infectados con HIV, y cuya mayor incidencia se encuentra en poblaciones de ascendencia andina y grupos étnicos minoritarios (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Fujiyoshi *et al.*, 1999; Blas *et al.*, 2013).

La paraparesia espástica tropical (PET) es una de las enfermedades más significativas que, junto a la leucemia de células T adultas (ATLL), se encuentra relacionada a la infección por el virus HTLV-1. La PET es una neuropatía crónica progresiva que afecta aproximadamente al 4% de los pacientes infectados con el virus (Goncalves *et al.*, 2008), la calidad de vida de estos pacientes se va reduciendo a medida que progresa la enfermedad debido a que las alteraciones en el caminar, el dolor lumbar y la disfunción sensorial y urinaria empeoran (Gotuzzo *et al.*, 2004). Actualmente no se cuenta con un tratamiento estandarizado para PET por lo que la búsqueda de drogas que puedan tener actividad contra esta enfermedad se hace necesaria.

Los síntomas que aquejan a los pacientes con PET estarían posiblemente relacionados a la sobre-activación de la vía NF- $\kappa$ B, la cual origina la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatorias, crecimiento celular, carcinogénesis, entre otras funciones celulares. Algunas investigaciones sobre las posibles causas del desarrollo de esta enfermedad encontraron una sobre-activación de la vía NF- $\kappa$ B en pacientes con PET, en comparación con personas sanas. La sobre-activación de esta vía en pacientes con PET estaría mediada por

efecto de la proteína Tax codificada por HTLV-1, la cual es capaz de activar la vía NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  y su posterior degradación por el proteosoma (Xiao *et al.*, 2001). La proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , cuando no se encuentra fosforilada, tiene por función mantener secuestrado al complejo NF- $\kappa$ B en el citoplasma evitando su translocación al núcleo y de esta manera inhibir la activación y expresión de los genes regulados por esta vía (Li & Verma, 2002).

Estudios en otras enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide o algunos tipos de cáncer, han mostrado evidencias de la posibilidad de modular la vía NF- $\kappa$ B utilizando drogas inhibitorias. Una de las drogas que ha mostrado resultados prometedores es la pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) que ha sido estudiada en algunas de estas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, el carcinoma renal y el cáncer de mama (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2009). Esta droga es capaz de disminuir los niveles de fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  y evitar su degradación por el proteosoma, lo que a su vez reduce la activación de la vía NF- $\kappa$ B y de esta manera modula la expresión de los genes controlados por NF- $\kappa$ B involucrados en los procesos celulares de proliferación y respuesta inflamatoria (Peng *et al.*, 2005).

En Perú, el grupo de HTLV de la Unidad de Epidemiología Molecular de la Universidad Cayetano Heredia ha venido realizando activamente diversos estudios sobre este virus y las enfermedades asociadas. En uno de estos estudios se evaluaron tanto factores virales y factores genéticos del hospedero como posibles marcadores de la PET en pacientes peruanos infectados con HTLV-1 (Talledo *et al.*, 2010). Asimismo, en otro estudio se investigó la posible implicancia del gen *NFKB1A* en la susceptibilidad de desarrollar PET en pacientes peruanos infectados con HTLV-1 (Talledo *et al.*, 2012). Asimismo, al medir la expresión del gen *NFKB1A*, el cual codifica a la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  se encontró que los pacientes con PET muestran una menor expresión de este en comparación a los asintomáticos HTLV-1 positivos



(Talledo *et al.*, 2014). Esto hace suponer que presentar una menor cantidad de I $\kappa$ B $\alpha$  sería una de las razones de que se presente una mayor actividad de la vía NF- $\kappa$ B en pacientes con PET, lo que generaría una mayor producción de citoquinas proinflamatorias y una alta proliferación de las células de estos individuos. De esta manera, el estudio de moléculas capaces de modular esta vía podría ser de gran beneficio para reducir la producción de citoquinas que podrían ser las causantes de la patología en los pacientes con PET.

Conforme a lo expresado anteriormente, este estudio propone analizar los efectos de la PDTC sobre la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  y el impacto sobre la vía NF- $\kappa$ B de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con PET, con el fin de sentar las bases para su posible uso como agente terapéutico para esta enfermedad.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. HTLV-1: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1

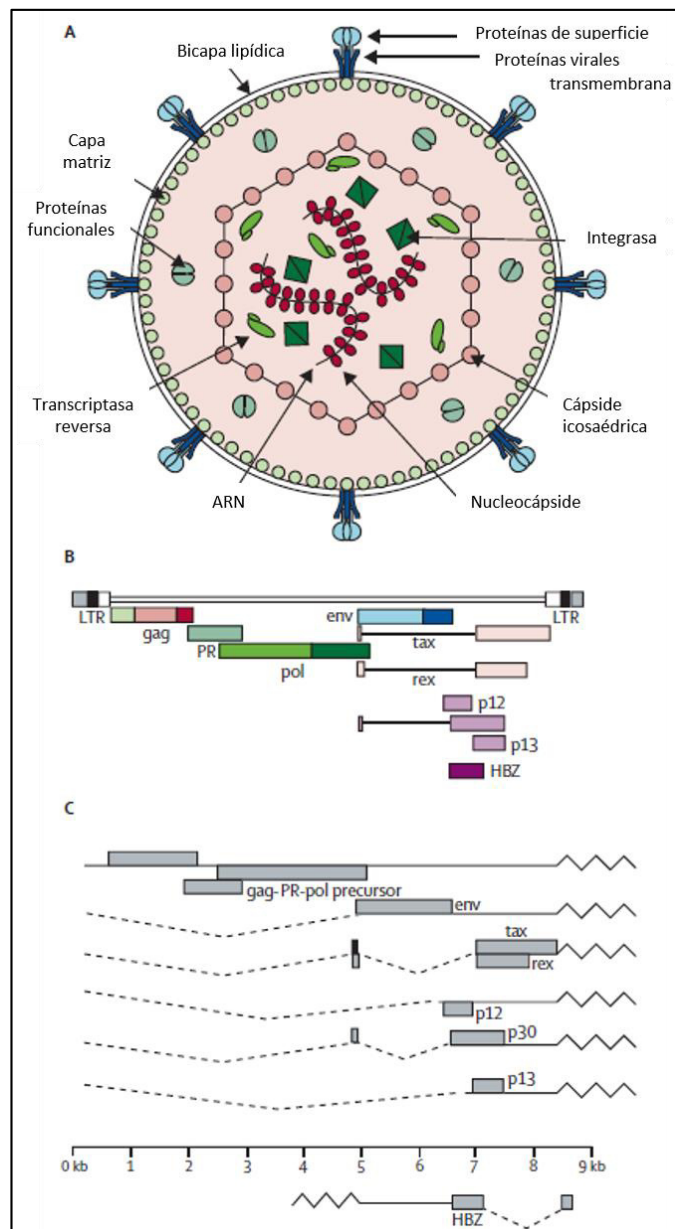
#### a. El virus

El virus de leucemia de células T humano tipo 1 es un virus de tipo C que pertenece al género *Deltaretrovirus* de la familia *Retroviridae*. HTLV-1 fue el primer retrovirus oncógeno humano conocido tras ser aislado de un paciente con una enfermedad maligna de células T, lo cual demostró la existencia de los retrovirus (Poiesz *et al.*, 1980).

Estructuralmente, como se muestra en la Figura 1, HTLV-1 presenta una conformación esférica con un diámetro aproximado de 0.2  $\mu\text{m}$  (Ohtsuki *et al.*, 1982). El genoma del virión, inmerso en la nucleocápside, y sus proteínas funcionales (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa) se encuentran protegidos por la cápside icosaédrica viral, la cual es rodeada de manera uniforme por una bicapa lipídica ubicada adyacentemente a la capa matriz que ayuda a organizar los componentes virales (Verdonck *et al.*, 2007).

El genoma de HTLV-1, de aproximadamente 9 kb, consiste en una molécula de ARN de cadena simple y de polaridad positiva. Asimismo, incluye genes estructurales y enzimáticos (*gag*, *prt*, *pol* y *env*), característicos en los retrovirus, flanqueados por dos repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) (Seiki *et al.*, 1983; Franchini, 1995). Adicionalmente, HTLV-1 cuenta con una región denominada pX, localizada entre el gen *env* y la región 3'-LTR, la cual contiene cuatro marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) superpuestos que codifican varias proteínas regulatorias como p12, p13, p30, Rex, Tax y HBZ (Gaudray *et al.*, 2002; Verdonck *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 2011) (Figura 1).

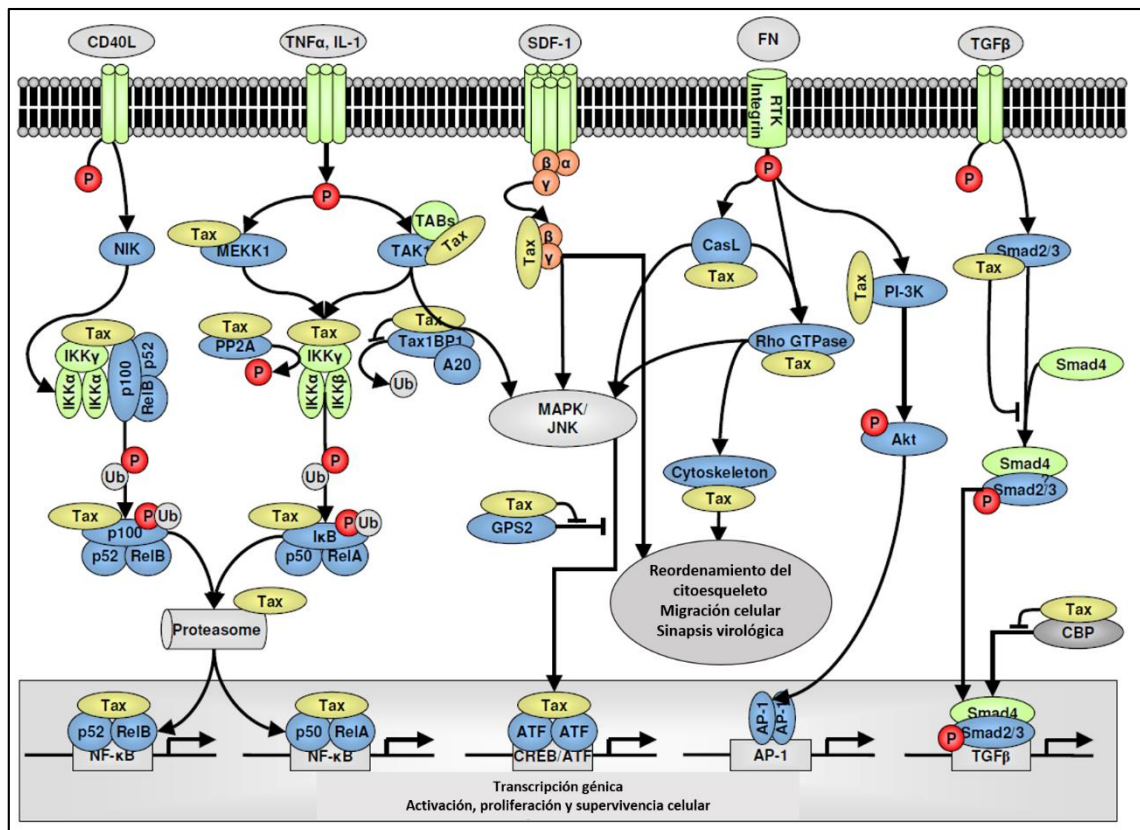
HTLV-1, durante su fase infectiva, convierte su genoma de ARN de cadena simple a ADN de cadena doble, el cual es insertado en el genoma de la célula hospedera y, después de un largo periodo de incubación, se da inicio a un proceso de expansión y selección clonal que conlleva a la activación de alguna de las enfermedades asociadas con HTLV-1 (Iwasaki, 1993; Gallo, 2005).



**Figura 1. Estructura y genoma de HTLV-1.** (A) Estructura esquemática de una partícula madura de HTLV-1. (B) Organización genómica de HTLV-1. (C) Mensajeros virales. Adaptado de Verdonck *et al.*, 2007.

## **b. La proteína Tax**

Entre las proteínas codificadas por el genoma de HTLV-1, Tax desempeña un rol esencial en la transcripción viral y en la transformación de la célula hospedera (Grassman *et al.*, 2005). Estas funciones pleiotrópicas de la proteína viral Tax están orquestadas por el amplio espectro de sus interacciones con proteínas de las células infectadas, tal como se ejemplifica en la Figura 2 (Boxus *et al.*, 2008). Una de las vías celulares más importantes afectada por la proteína Tax es la vía NF- $\kappa$ B, la cual juega un rol muy importante en la transformación de las células infectadas a través de la modulación de un amplio rango de genes implicados en apoptosis, proliferación, respuesta inmune e inflamación (Grassman *et al.*, 2005). Este efecto perjudicial de la proteína viral Tax sobre la vía NF- $\kappa$ B implica la immortalización y supervivencia de las células infectadas, las cuales son frecuentemente linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Harhaj & Harhaj, 2005), aunque también se ha reportado la infección de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, células dendríticas, monocitos y macrófagos (Koyanagi *et al.*, 1993; Nagai *et al.*, 2001, Jones *et al.*, 2008).



**Figura 2. Resumen de las interacciones de Tax de HTLV-1 con las proteínas de señalización celular de la célula hospedera.** Adaptado de Boxus *et al.*, 2008.

### c. Transmisión

La transmisión de HTLV-1 a individuos sanos se produce principalmente a través de tres vías: lactancia materna (transmisión vertical), transfusiones de sangre infectada y relaciones sexuales (transmisiones horizontales) (Gotuzzo *et al.*, 2004).

En el Perú, desde 1999, se viene realizando el despistaje de la infección por HTLV-1 en todos los bancos de sangre del país. De esta manera, se han reportado las tasas de transmisión de HTLV-1 de cada una de las vías descritas: la tasa de transmisión por lactancia materna se encuentra entre el 5.7 y el 37.5%, dependiendo de factores como la edad materna, la duración de la lactancia, la carga proviral materna y el número de alelos de HLA similares compartidos entre la madre y el hijo (Fujino & Nagata, 2000); la

tasa de transmisión referente a transfusiones sanguíneas completas se ha estimado entre el 50 y el 60%, aunque no se ha descrito la transmisión de este virus por transfusión de componentes acelulares (Larson & Taswell, 1988); mediante un estudio de trabajadoras sexuales peruanas, la incidencia media anual de la infección por este virus a través de relaciones sexuales se ha estimado en 1.6% de media anual, aunque el uso regular de preservativo disminuye significativamente la tasa de transmisión sexual de HTLV-1 (Muñoz *et al.*, 1997). Asimismo, es posible que se produzca la transmisión de HTLV-1, aunque en bajas proporciones, por vía intrauterina y peripartal o por el uso de agujas contaminadas entre los adictos a las drogas (Verdonck *et al.*, 2007).

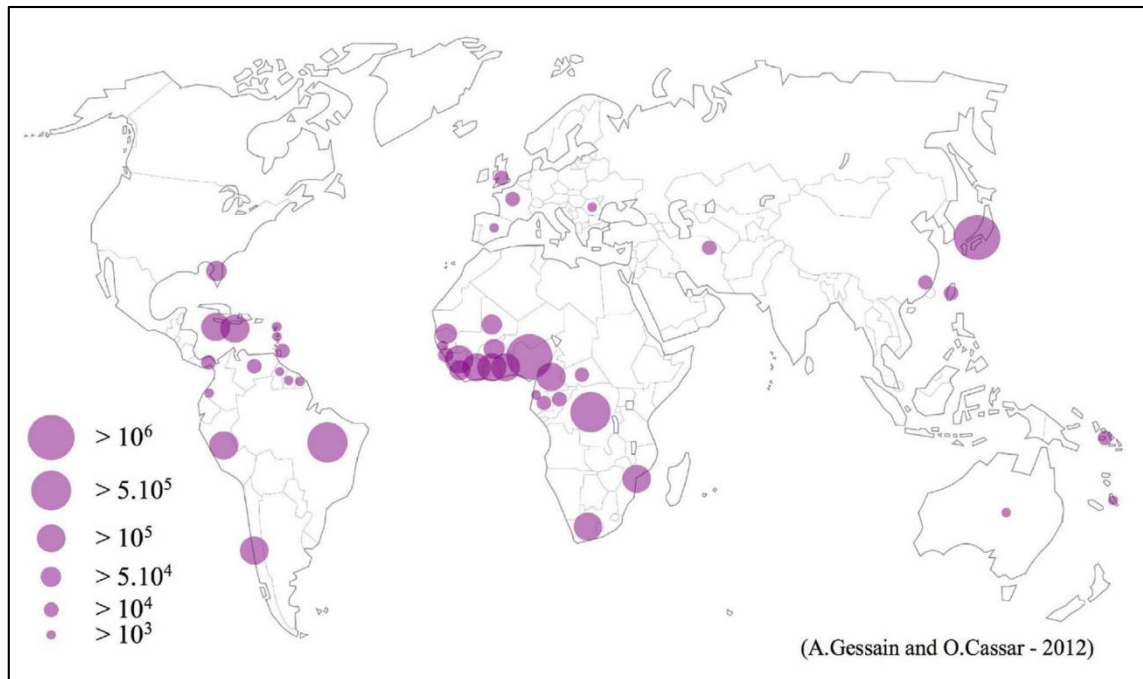
La propagación de HTLV-1 en el hospedero se produce generalmente, y de manera más eficiente, mediante la transferencia de partículas virales a través del contacto generado (sinapsis virológica) entre una célula infectada y otra sana (Igakura *et al.*, 2003; Carpentier *et al.*, 2015). Este modo de propagación viral denominado transmisión célula-célula es muy poco usual entre los retrovirus y se origina principalmente por los cambios conformacionales que la proteína Tax promueve en las células infectadas (Pique *et al.*, 2012; Bangham *et al.*, 2018). Sin embargo, también es posible que la propagación ocurra a través de la infección de células sanas por viriones libres, aunque este mecanismo no aporta significativamente en la propagación de HTLV-1 (Mazurov *et al.*, 2010).

#### **d. Epidemiología**

El número estimado de personas infectadas con HTLV-1, a nivel mundial, es alrededor de 5 a 10 millones, aunque la presencia de individuos infectados en estado asintomático podría elevar esta estimación (Gessain & Cassar, 2012).

A nivel epidemiológico, HTLV-1 no es un virus ubicuo, aunque se han encontrado focos de alto endemismo de infección que abarcan diferentes regiones a nivel mundial como el suroeste de Japón, algunas zonas de la Australo-Melanesia, África central y occidental (principalmente Irán), zonas reducidas de Europa (Rumania), el Caribe y Sudamérica (Figura 3) (Proietti *et al.*, 2005; Gessain & Cassar, 2012). Esta distribución epidemiológica fragmentada no ha sido bien entendida hasta el momento, aunque se cree que pueda estar asociada a un efecto fundador en algunos grupos seguido por la persistencia de una alta tasa de transmisión viral (Gessain & Cassar, 2012).

En el Perú se ha observado que uno de los grupos con mayor porcentaje de individuos infectados con HTLV-1 corresponde a las poblaciones de la región andina (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Fujiyoshi *et al.*, 2004); asimismo, se ha reportado una alta frecuencia de la infección por HTLV-1 en individuos de grupos amazónicos, particularmente en mujeres de la etnia Shipibo-Konibo (Alva *et al.*, 2012; Blas *et al.*, 2013). Esto es debido, probablemente, a la tradición aún presente en algunos grupos étnicos de practicar la lactancia materna durante largos periodos de tiempo, llegando incluso hasta los 2 años; asimismo, las limitaciones socioeconómicas presentes en el país, impiden muchas veces la práctica de la lactancia artificial (Gotuzzo *et al.*, 2004).



**Figura 3. Mapa de la distribución geográfica de los principales focos de la infección por HTLV-1.** Adaptado de Gessain & Cassar, 2012.

#### e. Enfermedades asociadas

Generalmente, los individuos infectados con HTLV-1 mantienen una infección crónica asintomática durante toda su vida, hecho que contribuye con la alta tasa de transmisión de este virus. Un bajo porcentaje de individuos infectados desarrollan alguna de las enfermedades asociadas con HTLV-1 (Gotuzzo *et al.*, 2004; Verdonck *et al.*, 2007)

Entre las enfermedades que mayor significancia clínica presentan se encuentran la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL, por sus siglas en inglés) y la paraparesia de espástica tropical (PET o HAM/TSP, por sus siglas en inglés). Se estima que el porcentaje de personas infectadas con HTLV-1 que podrían desarrollar estas enfermedades se encuentra entre el 0.3 y el 4% para PET y entre el 1 al 5% para ATLL (Goncalves *et al.*, 2008).

El aislamiento de partículas virales de HTLV-1 en células neoplásicas conllevó a la identificación de la posible asociación entre ATLL y la infección



por HTLV-1. Se describe a ATLL como una forma de leucemia de curso agudo con pobre respuesta a la quimioterapia que afecta principalmente a varones con edades comprendidas entre 50 y 60 años; asimismo, se han descrito formas menos agresivas cuyo comportamiento clínico se asemeja al de un linfoma crónico con compromiso dérmico extenso (Uchiyama *et al.*, 1977; Yamaguchi *et al.*, 1983; Tajima *et al.*, 1990; Gotuzzo *et al.*, 2004).

La paraparesia espástica tropical (PET) describía un cuadro neurodegenerativo crónico progresivo observado generalmente en áreas tropicales, cuya etiología era desconocida. Posteriormente, en 1985, su asociación con HTLV-1 fue establecida a través de la detección con anticuerpos contra este virus en individuos con PET. Los síntomas de esta enfermedad, que incluyen parálisis progresiva de los miembros inferiores, dolor lumbar, afecciones urinarias, entre otras, se presentan con mayor frecuencia en mujeres adultas (Gessain *et al.*, 1985; De las Casas *et al.*, 1996; Gotuzzo *et al.*, 2004).

Otras enfermedades también han sido asociadas con la infección por HTLV-1, posiblemente debido a la supresión del sistema inmunológico de los individuos. Entre estas enfermedades, podemos describir las siguientes: i) la infección por *Strongyloides stercoralis*, el cual se comporta como un patógeno oportunista en pacientes con sistema inmune comprometido por la infección por HTLV-1 (Scowden *et al.*, 1978); ii) la sarna noruega, esta infección dermatológica es causada por la diseminación de *Sarcoptes scabiei* que está condicionada a pacientes con inmunosupresión (Daisley & Charles, 1993); iii) Tuberculosis (TB), aunque la relación entre esta enfermedad y la infección por HTLV-1 continua en investigación, se ha descrito que los individuos con TB e infección por HTLV-1 tuvieron una progresión clínica más grave que aquellos individuos con TB y sin infección

por HTLV-1 (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997); iv) la dermatitis crónica infectiva, está caracterizada en niños por la presencia de eczema recidivante, lesiones simétricas en el cuero cabelludo, la cara, las ingles y los brazos, esta enfermedad está asociada con infecciones cutáneas con *Staphylococcus aureus* o estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, provocadas por la supresión del sistema inmunológico (Lagrenade *et al.*, 1990).

## **2. HAM/TSP o PET: Paraparesia Espástica Tropical**

### **a. La enfermedad**

La paraparesia espástica tropical es una mielopatía inflamatoria crónica progresiva relacionada a la infección por HTLV-1. Generalmente, esta enfermedad afecta a personas adultas, mayores de 50 años, que provienen de regiones consideradas focos endémicos de infección por este virus, encontrándose mayor prevalencia en mujeres (Orland *et al.*, 2003). En el Perú, esta enfermedad suele presentarse con mayor frecuencia en mujeres y los síntomas se inician generalmente a los 45 años (De las Casas *et al.*, 1996; Gotuzzo *et al.*, 2004).

Las características clínicas de esta enfermedad se presentan como paraparesia espástica simétrica progresiva, es decir, rigidez de los miembros inferiores acompañada de parálisis progresiva; asimismo se muestran alteraciones en el caminar, dolor lumbar y disfunción sensorial y urinaria (Gotuzzo *et al.*, 2004). Estudios sobre la calidad de vida de pacientes con PET han mostrado una drástica reducción de esta conforme progresa la enfermedad, aunque la actividad física ha evidenciado asociación positiva con la calidad de vida de estos pacientes (Martins *et al.*, 2012).

La patología de la PET muestra un patrón bifásico. Este patrón se inicia con una fase inflamatoria caracterizada por la infiltración linfocítica perivascular de la médula espinal, seguida por una etapa donde prevalecen la neurodegeneración, la atrofia y la cicatrización. La mayor característica histopatológica de la PET es la inflamación crónica de la materia blanca y gris de la médula espinal seguida de un proceso degenerativo de estas zonas, así como una reducción posterior de la medula espinal como se muestra en la Figura 4 (Iwasaki, 1993).



**Figura 4. Imagen por resonancia magnética de una médula espinal atrofiada en un paciente con PET.** La delgada médula espinal (mostrada en negro) está indicada con flechas. La imagen interna pequeña muestra una vista anteroposterior de la médula. Adaptado de Bangham *et al.*, 2015.

## **b. Factores de riesgo**

Aunque aún no se ha determinado una causa fehaciente que esté directamente implicada en el inicio y desarrollo de la PET en individuos infectados por HTLV-1, se ha descrito a la carga proviral como el único factor consistente asociado a la presencia de PET en diversas poblaciones. Asimismo, se han reportado otros factores de riesgo relacionados al desarrollo de esta enfermedad, entre los que destacan los factores genéticos virales y del hospedero, aunque estos factores deben ser estudiados en un mayor número de poblaciones para corroborar su asociación a la PET.

### **i. Carga proviral (CPV)**

Este factor de riesgo es el predictor más robusto asociado a la presencia de la PET, por ello, resulta esencial que se realice a los individuos que han sido diagnosticados con infección por HTLV-1 (Bangham *et al.*, 2015). La carga proviral mide el número de copias de ADN de HTLV-1 en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y, generalmente se expresa como el porcentaje de PBMC infectadas, asumiendo que cada PBMC lleva insertado un único genoma proviral (Cook *et al.*, 2012).

### **ii. Genética del virus**

HTLV-1 presenta variaciones minúsculas en sus secuencias dentro de un mismo hospedero y entre hospederos (Daenke *et al.*, 1990). A pesar de ello, basándose en la diversidad nucleotídica de la región LTR de su genoma, HTLV-1 ha sido categorizado en siete genotipos, nombrados desde la A hasta la G (Verdonck *et al.*, 2007), siendo el genotipo A el que se encuentra más extendido a nivel mundial (Bangham *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ha encontrado un único genotipo que se encuentre

asociado con el desarrollo de la PET, aunque sí se ha reportado la asociación de algunos genotipos de HTLV-1 con el riesgo de desarrollo de esta enfermedad (Daenke *et al.*, 1990; Nozuma *et al.*, 2017).

### iii. **Genética del hospedero**

Aún no se conoce de manera precisa cuál es el rasgo determinante para el desarrollo de la PET, pero ciertos factores intrínsecos relacionados con la respuesta inmunológica de los individuos infectados con HTLV-1 han sido fuertemente asociados con el desarrollo de la enfermedad.

El principal factor del hospedero asociado a la PET es el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), especialmente la clase I. El genotipo de un individuo para el sistema HLA clase I determina la especificidad y la eficacia de la respuesta de sus linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) a la infección viral. Asimismo, la respuesta de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> establece el mantenimiento de la carga proviral y, por lo tanto, determina el riesgo del individuo infectado con HTLV-1 a desarrollar la PET (Bangham *et al.*, 2015).

Adicionalmente, también se ha reportado la asociación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) en un pequeño grupo de genes (IL6, IL10, TNF, entre otros) con el desarrollo de la PET en individuos infectados con HTLV-1 (Talledo *et al.*, 2012). Sin embargo, los estudios sobre los hallazgos de factores genéticos del hospedero han sido reducidos y aislados, por lo que su impacto sobre el desarrollo de la PET aún sigue siendo incierto ya que los estudios no han sido replicados en distintas poblaciones.

#### **iv. Otros factores de riesgo**

Adicional a los factores de riesgo con mayor asociación al desarrollo de la PET, detallados anteriormente, también se han descrito una serie de factores que tienen influencia sobre el riesgo de desarrollar paraparesia espástica tropical. Entre los factores más conocidos y con mayor influencia sobre el riesgo de desarrollo de la PET se encuentran la edad, ya que se ha observado que la edad de mayor ocurrencia de la PET es 50 años, así como también, esta enfermedad es muy poco frecuente en niños; el sexo, puesto que se ha descrito ampliamente en distintas poblaciones que la frecuencia de desarrollo de la PET es aproximadamente tres veces mayor en mujeres que en varones; y la forma de adquisición de la infección, debido a que se plantea que la infección por trasplante de órganos o transfusión sanguínea promueve un desarrollo más rápido de la PET, aunque los estudios aún no son concluyentes sobre la significancia de alguna de las rutas de infección en el desarrollo de la enfermedad (Osame *et al.*, 1990; Maloney *et al.*, 1998; Toro *et al.*, 2003; Bangham *et al.*, 2015).

#### **c. Diagnóstico**

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza utilizando los recursos clínicos y de laboratorio. En el primer caso, es decir, en el diagnóstico clínico de la PET, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1988 una guía para el diagnóstico de esta enfermedad, la cual se modifica de acuerdo a los nuevos avances en el conocimiento de la PET; adicionalmente, un grupo de investigadores de Brasil desarrollaron también una propuesta alternativa de criterios diagnósticos para la PET, la cual se muestra en la Figura 5 (Castro-Costa *et al.*, 2006).

Para un correcto diagnóstico de la paraparesia espástica tropical también se debe recurrir de manera necesaria al diagnóstico de laboratorio por métodos moleculares y serológicos. En este sentido, la detección de HTLV-1, sea por medio de anticuerpos o de ADN viral, es requerida para el diagnóstico de la PET. Asimismo, la cuantificación de la carga proviral es un elemento necesario para el seguimiento de la cantidad de virus presente en el individuo infectado y evaluar el riesgo de desarrollo de la PET. De la misma manera, otros estudios de laboratorio que resultan útiles para un mejor diagnóstico de la PET son la evaluación de citoquinas, quimoquinas y otros biomarcadores (Bangham *et al.*, 2015; Lezin *et al.*, 2005).

<p><b>I. Criterio clínico</b></p>
<p>El cuadro clínico complejo de la paraparesia espástica crónica no siempre se ve cuando el paciente se presenta por primera vez. Un solo síntoma o signo físico puede ser la única evidencia de PET temprano.</p>
<p>A. Incidencia de edad y sexo</p>
<p>Principalmente esporádico y en adultos, pero a veces familiar; ocasionalmente visto en la infancia; predominancia en mujeres.</p>
<p>B. Inicio</p>
<p>Suele ser insidioso, pero puede ser repentino.</p>
<p>C. Principales manifestaciones neurológicas</p>
<p>1. La paraparesia espástica crónica, que generalmente progresa lentamente, a veces permanece estática después de la progresión inicial.</p>
<p>2. Debilidad de las extremidades inferiores, proximalmente más marcadas.</p>
<p>3. La alteración de la vejiga suele ser una característica temprana. El estreñimiento generalmente ocurre más tarde; la impotencia o disminución de la libido es común.</p>
<p>4. Los síntomas sensoriales como hormigueo, alfileres y agujas, ardor, etc. son más prominentes que los signos físicos objetivos.</p>
<p>5. El dolor lumbar bajo con radiación a las piernas es común.</p>
<p>6. El sentido de vibración se ve frecuentemente afectado; la propiocepción se ve afectada con menos frecuencia.</p>
<p>7. Hiperreflexia de las extremidades inferiores, a menudo con clonus y signo de Babinski.</p>
<p>8. Hiperreflexia de miembros superiores; los signos positivos de Hoffmann y Tromner son frecuentes; la debilidad puede estar ausente.</p>
<p>9. Sacudida exagerada de la mandíbula en algunos pacientes.</p>
<p>D. Hallazgos neurológicos menos frecuentes</p>
<p>Signos cerebelosos, atrofia óptica, sordera, nistagmo, otros déficits de nervios craneales, temblor de manos, tirón de tobillo ausente o deprimido.</p>
<p>Las convulsiones, el deterioro cognitivo, la demencia o la alteración de la conciencia son poco frecuentes.</p>
<p>E. Otras manifestaciones neurológicas que pueden estar asociadas con la PET</p>
<p>Atrofia muscular, fasciculaciones (poco frecuente), polimiositis, neuropatía periférica, polirradiculopatía, neuropatía craneal, meningitis, encefalopatía.</p>
<p>F. Manifestaciones sistémicas no neurológicas que pueden estar asociadas con HAM / TSP</p>
<p>Alveolitis pulmonar, uveítis, síndrome de Sjögren, artropatía, vasculitis, ictiosis, crioglobulinemia, gammapatía monoclonal, leucemia/linfoma de células T adultas (ATTL).</p>
<p><b>II. Diagnóstico de laboratorio</b></p>
<p>A. Presencia de anticuerpos o antígenos HTLV-1 en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR).</p>
<p>B. El LCR puede mostrar pleocitosis linfocítica leve.</p>
<p>C. Los linfocitos lobulados pueden estar presentes en la sangre y/o LCR.</p>
<p>D. Aumento leve a moderado de proteína puede estar presente en el LCR.</p>
<p>E. Aislamiento viral (cuando sea posible de sangre) y/o LCR.</p>

**Figura 5. Criterios de diagnóstico para la paraparesia espástica tropical (PET) establecido por la OMS.** En la guía se enlistan una serie de criterios para el diagnóstico clínico y de laboratorio. Adaptada de Castro-Costa *et al.*, 2006.

#### d. Patogénesis

A la fecha, no se conoce de manera precisa los mecanismos mediante los que HTLV-1 logra inducir el desarrollo de la paraparesia espástica tropical. Sin embargo, pese a la ausencia de modelos animales que permitan establecer dichos mecanismos, Araujo y Silva (2006) describen las tres hipótesis principales que permiten explicar la patogénesis de esta enfermedad:

- Toxicidad Directa: las células T CD8<sup>+</sup> cruzan la barrera hemato-encefálica y atacan específicamente a las células gliales infectadas con HTLV-1.
- Autoinmunidad: que sugiere que las células gliales presentan antígenos similares a los del virus, por lo que también son atacadas por los linfocitos T.
- Daño Colateral (*Bystander damage*, en inglés): según esta hipótesis, las células T CD4<sup>+</sup> infectadas por HTLV-1 inducen a las células gliales a secretar ciertas citoquinas, como TNF- $\alpha$ , que llegan a ser mielinotóxicas.

De las tres hipótesis que se plantean como mecanismos de patogénesis para la paraparesia espástica tropical, la explicación que a la fecha presenta mayor aceptación es la de toxicidad directa (Araujo & Silva, 2006).

Según esta hipótesis, la PET consiste en una infiltración inicial de células mononucleares en el sistema nervioso central que deviene en desmielinización y pérdida neuronal. Al inicio del proceso de la infiltración, una mayoritaria presencia de células T CD4<sup>+</sup> es observada, la cual va cambiando al aumentar la proporción de las células T CD8<sup>+</sup> a lo largo del tiempo de afección (Bangham, 2018).



Se ha descrito que la causa más probable para el ingreso masivo de células T CD4<sup>+</sup> activadas es la infección de estas células por HTLV-1 y su posterior activación debido a mecanismos celulares mediados por la proteína viral Tax en dichas células infectadas, aunque también la vía de estimulación antigénica contribuye en el inicio de la patogénesis de la PET (Bangham, 2018). Asimismo, se ha reportado que la proteína viral Tax induce la expresión de ciertas moléculas de adhesión (por ejemplo, ALCAM también denominada CD166) que facilitan la entrada de las células infectadas al sistema nervioso central (Curis *et al.*, 2016). Una vez ocurrido el ingreso de estas células infectadas, las lesiones que ocurren en la médula espinal, que son provocadas por focos inflamatorios generados por los procesos inmunológicos mediados por estas células infectadas, originan los principales signos y síntomas de la PET (Bangham, 2018).

Como ya se ha descrito anteriormente, la proteína viral Tax juega un rol pivotante en la patogénesis de la PET. Esta proteína viral es capaz de influir en los mecanismos celulares de los linfocitos infectados para que, inicialmente, se produzca la infiltración en el sistema nervioso central y, posteriormente, se generen los daños en la médula espinal producto de los procesos inflamatorios generados por estas células infectadas.

Sin embargo, Tax puede influir en estos procesos a través de una de las vías celulares con mayor trascendencia para la célula, la vía NF- $\kappa$ B. Esta vía controla la expresión de genes relevantes para la supervivencia, proliferación, procesos inflamatorios, entre otros procesos celulares; y que, cuando está influenciada por HTLV-1, específicamente por la proteína viral Tax, es capaz de comprometer el normal funcionamiento de la célula, como ocurre durante el desarrollo de la PET, por ejemplo (Grassman *et al.*, 2005; Curis *et al.*, 2016).

### **3. NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas**

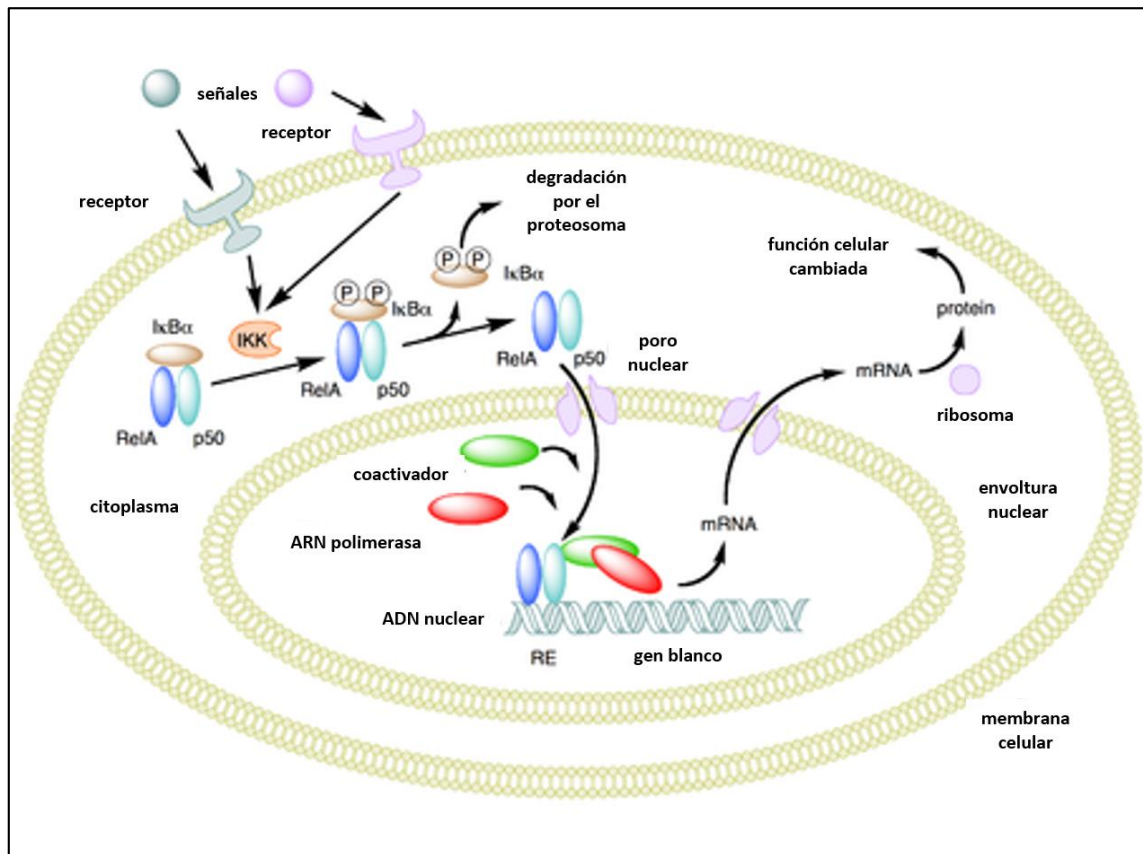
#### **a. La vía celular NF- $\kappa$ B**

La vía celular NF- $\kappa$ B cumple uno de los roles más trascendentales en el mantenimiento de los procesos celulares al encargarse de la regulación transcripcional de los genes asociados a la inmunomodulación y el crecimiento, la activación, la diferenciación y la supervivencia celular, entre otros procesos celulares de vital importancia (Harhaj & Harhaj, 2005).

El estudio de la vía NF- $\kappa$ B ha sido bastante amplio desde sus primeras descripciones, hace ya más de 30 años, y se ha acumulado gran conocimiento sobre esta vía. Se ha descrito que la vía NF- $\kappa$ B se encuentra reducida y latente en la mayoría de células a través del secuestro, en el citoplasma, de las proteínas de la familia NF- $\kappa$ B (RelA, RelB, p50, p100, entre otras) por parte de las proteínas inhibitorias de esta vía pertenecientes a la familia I $\kappa$ B; pero la activación de la vía NF- $\kappa$ B puede ser llevada a cabo a través de tres vías distintas que pueden ser interdependientes: la vía canónica, la vía no canónica y una tercera vía que aún sigue en estudio (Gilmore, 2006).

La vía canónica, esquematizada en la Figura 6, es conocida como la forma clásica de activación de la vía NF- $\kappa$ B, ya que ha sido la primera en ser descrita y debido a que es capaz de responder a una gran variedad de estímulos extracelulares (Sun, 2011). El proceso de activación de la vía NF- $\kappa$ B por parte de la vía canónica está mediada por señales que provienen de diversos tipos de estímulos extracelulares, los cuales inician una cascada de señalización que convergen en la activación de un complejo quinasa denominado complejo IKK (complejo quinasa del I $\kappa$ B) (Hayden & Ghosh, 2008). El complejo IKK activo es capaz de fosforilar a las proteínas de la

familia I $\kappa$ B, que se encuentran inhibiendo la activación de la vía NF- $\kappa$ B, lo que promueve la translocación de las proteínas de la familia NF- $\kappa$ B (p50 y RelA(p65), en la vía canónica) al núcleo y la posterior activación de esta vía (Harhaj & Harhaj, 2005).



**Figura 6. Esquema de la activación de la vía NF- $\kappa$ B a través de la vía canónica.** En el esquema se muestra la ruta de activación canónica y las proteínas participantes (RelA, p50, I $\kappa$ B $\alpha$ , etc.). Adaptado de Wikipedia.

#### **b. La proteína I $\kappa$ B $\alpha$ : inhibidor de la activación de la vía NF- $\kappa$ B en la ruta canónica**

En la ruta canónica de activación de la vía NF- $\kappa$ B, el complejo de proteínas que mantiene el control fino de dicha activación, a través de un proceso de secuestro de las unidades del complejo NF- $\kappa$ B en el citoplasma, pertenecen a la familia I $\kappa$ B, donde están incluidas las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  e I $\kappa$ B $\gamma$ , las cuales cumplen funciones distintas dentro del complejo inhibidor de la vía NF- $\kappa$ B (Ghosh *et al.*, 1998; Ghosh & Karin, 2002). Este grupo de

proteínas se caracterizan por presentar repeticiones de ankirina en la posición C-terminal, lo cual les confiere la capacidad de interactuar con las proteínas del complejo NF- $\kappa$ B (Yamamoto & Gaynor, 2004).

Dentro de la familia I $\kappa$ B, la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  es uno de los participantes más sobresalientes en el proceso de inhibición de la activación de la vía NF- $\kappa$ B, ya que es una de las proteínas principales dentro del complejo inhibitorio que logra enmascarar las señales de localización nuclear presentes en las proteínas del complejo NF- $\kappa$ B y, de esta manera, reduce la translocación de p50 y p65 al núcleo evitando la activación de los genes asociados a esta vía celular, lo que permite mantener la inhibición de la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Bonizzi & Karin, 2004).

Sin embargo, la relevancia de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  también radica en su rol de regulador fino de activación de la vía NF- $\kappa$ B. Es decir, bajo una serie de estímulos extracelulares como citoquinas, quimoquinas, productos virales, etc., la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilada por acción del complejo quinasa IKK, específicamente en las posiciones Ser32 y Ser36, que, a su vez, induce el marcaje de ubiquitinación en la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en las posiciones Lys21 y Lys22 permitiendo su degradación por parte del proteosoma (Bonizzi & Karin, 2004). De esta manera, al ser degradada la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , el dímero Rel A y p50 (complejo NF- $\kappa$ B) queda libre y con la capacidad de ser translocado al núcleo donde puede dar inicio a la activación de la vía NF- $\kappa$ B a través de la regulación de los genes asociados a dicha vía (Karin, 1999).

### **c. Genes asociados a la vía NF- $\kappa$ B**

A la fecha se conocen más de ciento cincuenta genes blanco de la vía NF- $\kappa$ B en una gran variedad de tipos celulares y en respuesta a un vasto número de agentes activadores. En una revisión sobre los activadores y genes blanco de la vía NF- $\kappa$ B, Pahl (1999) documentó una gran lista de estos

genes a los que categorizó de acuerdo a sus funciones como, por ejemplo, citoquinas/quimoquinas y sus moduladores, inmunoreceptores, moléculas de adhesión celular, proteínas involucradas en el proceso de presentación de antígenos, etc.

Debido a la gran capacidad de la vía NF- $\kappa$ B para activar la expresión de una serie de genes relacionados a la activación de la inflamación como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, etc., se ha propuesto que esta vía representa al regulador principal de la inflamación en las células (Barnes & Karin, 1997). En la misma línea, se ha observado también el potencial que tiene la vía NF- $\kappa$ B para impedir la muerte celular por apoptosis a través de la regulación de genes como Bfl/A1, Bcl-xL, Nr13 (Pahl, 1999); lo cual promueve la prolongación anormal de la supervivencia celular y, en consecuencia, la exacerbación de los efectos de la vía NF- $\kappa$ B en células que han comprometido su destino debido a la infección por diversos agentes como los virus, por ejemplo.

Sin embargo, la vía NF- $\kappa$ B también es capaz de autoregularse a través del control que ejerce sobre genes involucrados en la regulación de su activación. Uno de los genes más importantes relacionado en esta autoregulación es el gen NFKBIA, el cual codifica a la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  que se encarga de mantener inactiva a la vía NF- $\kappa$ B mediante el secuestro en el citoplasma del complejo p50-p65 en la ruta canónica (Sun *et al.*, 1993).

#### **d. La vía NF- $\kappa$ B en la paraparesia espástica tropical**

En pacientes con PET se ha observado que gran parte de la sintomatología y la patogénesis de la enfermedad se encuentra asociada con una exacerbada actividad de la vía NF- $\kappa$ B y la amplificación de la respuesta de los genes asociados (McCormick *et al.*, 2011). Dicha actividad anormal de la vía NF- $\kappa$ B ha sido relacionada con la infección por el virus HTLV-1, específicamente con el accionar de la proteína viral Tax, la cual es capaz de

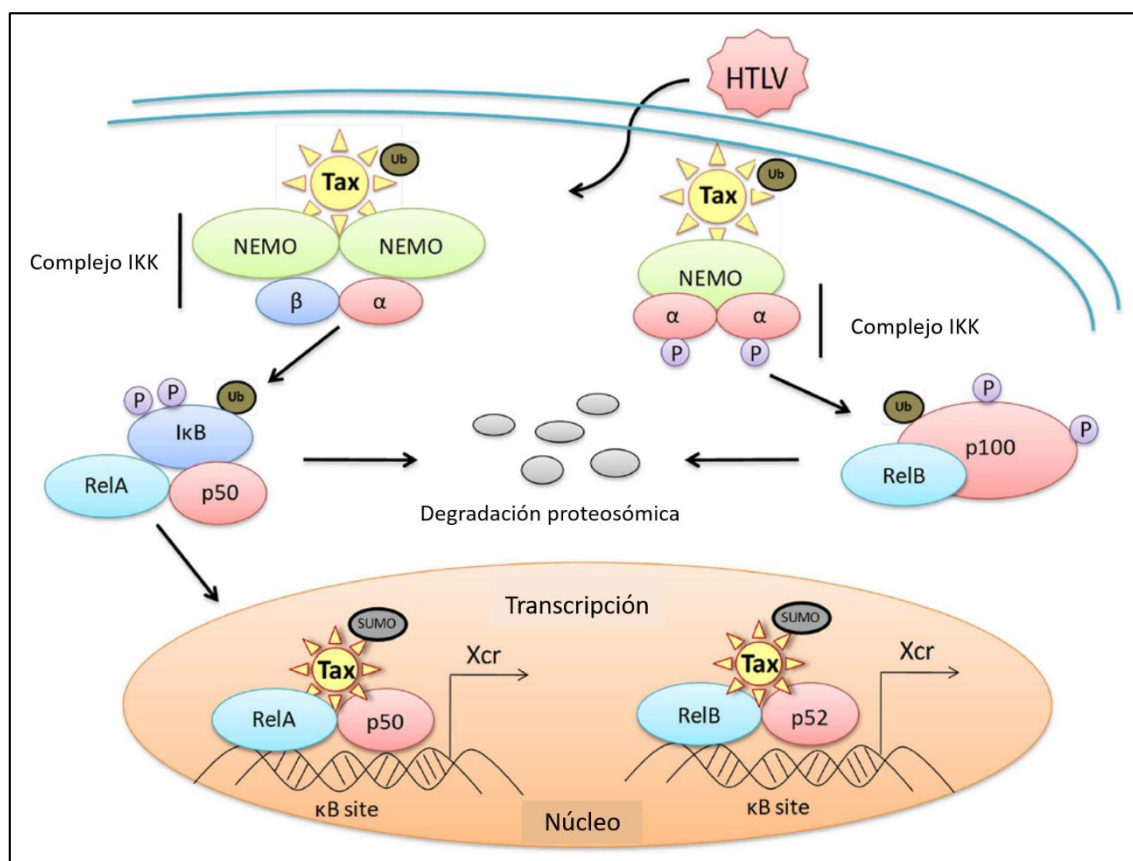
generar diversos cambios en el comportamiento y el destino de las células infectadas (Fochi *et al.*, 2018; Curren *et al.*, 2012).

Según ha sido descrito en la vía canónica de NF- $\kappa$ B, la proteína viral Tax promueve una mayor fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  en células infectadas con HTLV-1, lo cual promueve el marcaje por ubiquitinación y la degradación constante de dicho inhibidor, lo que a su vez permite la liberación de las proteínas RelA y p50 (complejo NF- $\kappa$ B) en el citoplasma para que sean translocadas al núcleo donde promoverán la expresión de varios genes asociados a esta vía, entre ellos los genes relacionados a su autoregulación, permitiendo así la activación recurrente de la vía NF- $\kappa$ B (Xiao *et al.*, 2001).

La manera en la que la proteína viral Tax es capaz de activar la vía NF- $\kappa$ B a través de la fosforilación y degradación recurrente del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , ha sido hipotetizada desde varios frentes. Sin embargo, la hipótesis más extendida debido a la evidencia bioquímica y molecular encontrada explica que, durante la infección por HTLV-1, la proteína viral Tax es capaz de secuestrar al complejo quinasa IKK a través de la gran afinidad que presenta con la subunidad IKK- $\gamma$  y el potente estímulo que genera sobre la actividad catalítica de las subunidades IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ , las cuales están encargadas de realizar la fosforilación al inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  para promover su degradación y, de esta manera, iniciar la activación persistente de la vía NF- $\kappa$ B, tal como se muestra en la Figura 7 (Harhaj *et al.*, 2000; Curren *et al.*, 2012).

La activación crónica de la vía NF- $\kappa$ B en células infectadas con HTLV-1 impulsa la expresión persistente de una serie de genes que promueven la patogénesis y el desarrollo de la paraparesia espástica tropical (Bangham, 2018). Entre los genes activados se encuentran aquellos involucrados en la promoción de la actividad inflamatoria como los genes que codifican citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc.) que, a su vez, propician

el llamado a las células mediadoras de inflamación como los linfocitos T citotóxicos (CTLs), lo cual, en conjunto, termina induciendo un daño irreversible en el tejido de la médula espinal que provoca el desarrollo de la PET (Bangham, 2018). Asimismo, la expresión de un grupo de genes relacionados con la evasión de la muerte celular por apoptosis y la proliferación celular también es estimulada por la activación crónica de la vía NF- $\kappa$ B en células infectadas con HTLV-1, la expresión de estos genes promueve una expansión clonal de linfocitos infectados cerca de las zonas de infiltración a la médula espinal, lo cual genera nidos de inflamación y concentraciones locales crónicamente altas de sustancias proinflamatorias provocando la degeneración de neuronas cercanas (Bangham, 2018).



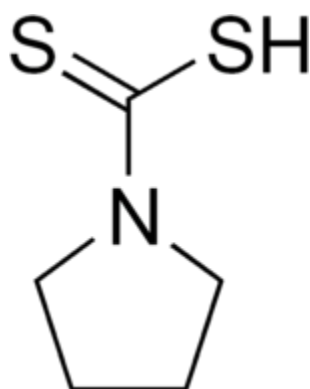
**Figura 7. Modelo de activación de las vías canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B mediada por Tax.** La activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B en células infectadas con HTLV-1 se muestra en la parte izquierda. La degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  es mediada por Tax para la translocación al núcleo de RelA-p50 para la posterior activación de genes. Adaptado de Curren *et al.*, 2012.

#### 4. PDTC: Pirrolidina Ditiocarbamato

##### a. PDTC

La pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) es un compuesto químico que pertenece al grupo de las pirrolidinas, las cuales son usadas como unidades estructurales básicas en la síntesis de moléculas más complejas como la epolamina, el climazol, el bepridilo, entre otras. Asimismo, la PDTC es miembro del grupo de los ácidos carbámicos o carbamatos, los cuales presentan propiedades antioxidantes y de quelantes de metales.

La fórmula molecular de este compuesto es  $C_5H_9NS_2$ , presenta una masa molar de 147.25 g/mol y, generalmente, es presentado en forma de sal como la pirrolidinaditiocarbamato de amonio, la cual es extendidamente ofrecida por las casas comerciales. La estructura de la PDTC muestra de manera característica un anillo saturado de cinco átomos, uno de nitrógeno y cuatro de carbono, propio de las pirrolidinas y, a su vez, una rama de ácido carbámico conteniendo dos átomos de azufre. La estructura de este compuesto se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Estructura de la pirrolidina ditiocarbamato (PDTC).** La estructura muestra de manera característica el anillo de pirrolidina y los dos átomos de azufre. Tomado de Wikipedia.



#### **b. PDTC y la vía NF- $\kappa$ B**

La pirrolidina ditiocarbamato al pertenecer al grupo de los carbamatos, también muestra las propiedades antioxidantes y de quelantes de metales de este grupo químico, pero también ha sido reportado como un potente inhibidor de la vía NF- $\kappa$ B (Schreck *et al.*, 1992). Sin embargo, la PDTC parece ser el inhibidor más efectivo dentro del grupo de los carbamatos debido a la facilidad que posee para atravesar la membrana celular y a su estabilidad prolongada frente al pH fisiológico propio del ambiente celular (Cuzzocrea *et al.*, 2002).

En diversas investigaciones se ha demostrado que la pirrolidina ditiocarbamato, a través de la influencia que tiene sobre inhibición de la vía NF- $\kappa$ B, promueve funciones de distinto tipo para una gran variedad de estirpes celulares. Dichas funciones provocadas por la PDTC abarcan desde actividades antiinflamatorias, de regulación en la adhesión y migración celular, detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis, entre otras muchas funciones celulares relacionadas no solo con la vía NF- $\kappa$ B, sino con las propiedades antioxidantes de la PDTC (Liu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2010; Tahata *et al.*, 2014).

Las funciones celulares asociadas a la actividad de la PDTC han sido estudiadas ampliamente; sin embargo, la manera de cómo este compuesto modifica las funciones celulares no ha sido totalmente esclarecida. Algunos estudios indican que las propiedades antioxidantes de la PDTC no son suficientes para generar toda la gama de respuestas asociadas a este compuesto, ya que también se han descrito otras funciones, como su acción como quelante de metales y posiblemente su actividad prooxidante, las cuales incluso contribuyen con efectos antivirales en células infectadas (Gaudernack *et al.*, 2002; Cuzzocrea *et al.*, 2002; Tahata *et al.*, 2014).

Todas las características descritas anteriormente relacionadas con la modulación del antioxidante PDTTC sobre los efectos de la vía NF- $\kappa$ B en distintos modelos, tanto animales como celulares, permiten hipotetizar la posibilidad de que dichos efectos también podrían ser observados en células de pacientes infectados con HTLV-1, específicamente aquellos que han desarrollado paraparesia espástica tropical.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1. HIPÓTESIS**

La pirrolidina ditiocarbamato reduce la proliferación celular y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes con paraparesia espástica tropical mediante la modulación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B.

#### **2. OBJETIVOS**

##### **a. Objetivo General**

Evidenciar el efecto *in vitro* de la PDTC sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B, la proliferación celular y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica aisladas de pacientes con paraparesia espástica tropical.

##### **b. Objetivos Específicos**

- Determinar la concentración letal media y la concentración de trabajo de la PDTC sobre las PBMC.
- Evaluar los niveles de proliferación celular de PBMC tratadas y no tratadas con PDTC.
- Medir la expresión de la citoquina IFN- $\gamma$  en PBMC tratadas y no tratadas con PDTC.
- Cuantificar los niveles de activación de la vía NF- $\kappa$ B en proteínas intracelulares de PBMC tratadas y no tratadas con PDTC.

#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

###### **a. POBLACIÓN**

La población de este estudio comprendió al grupo de personas de la ciudad de Lima y de distintas provincias del Perú, que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMT – AvH) con sospecha y/o diagnóstico de infección por HTLV-1 que forma parte de estudios de cohorte clínica en HTLV. Los pacientes procedieron de los consultorios de neurología, medicina general, y medicina física y rehabilitación del Hospital Nacional Cayetano Heredia. Algunos pacientes fueron referidos de clínicas u otros hospitales; asimismo, otros pacientes por decisión personal al ser familiar de un caso índice fueron incluidos en la cohorte clínica. En resumen, en el IMT-AvH se enrolan por lo general los siguientes casos:

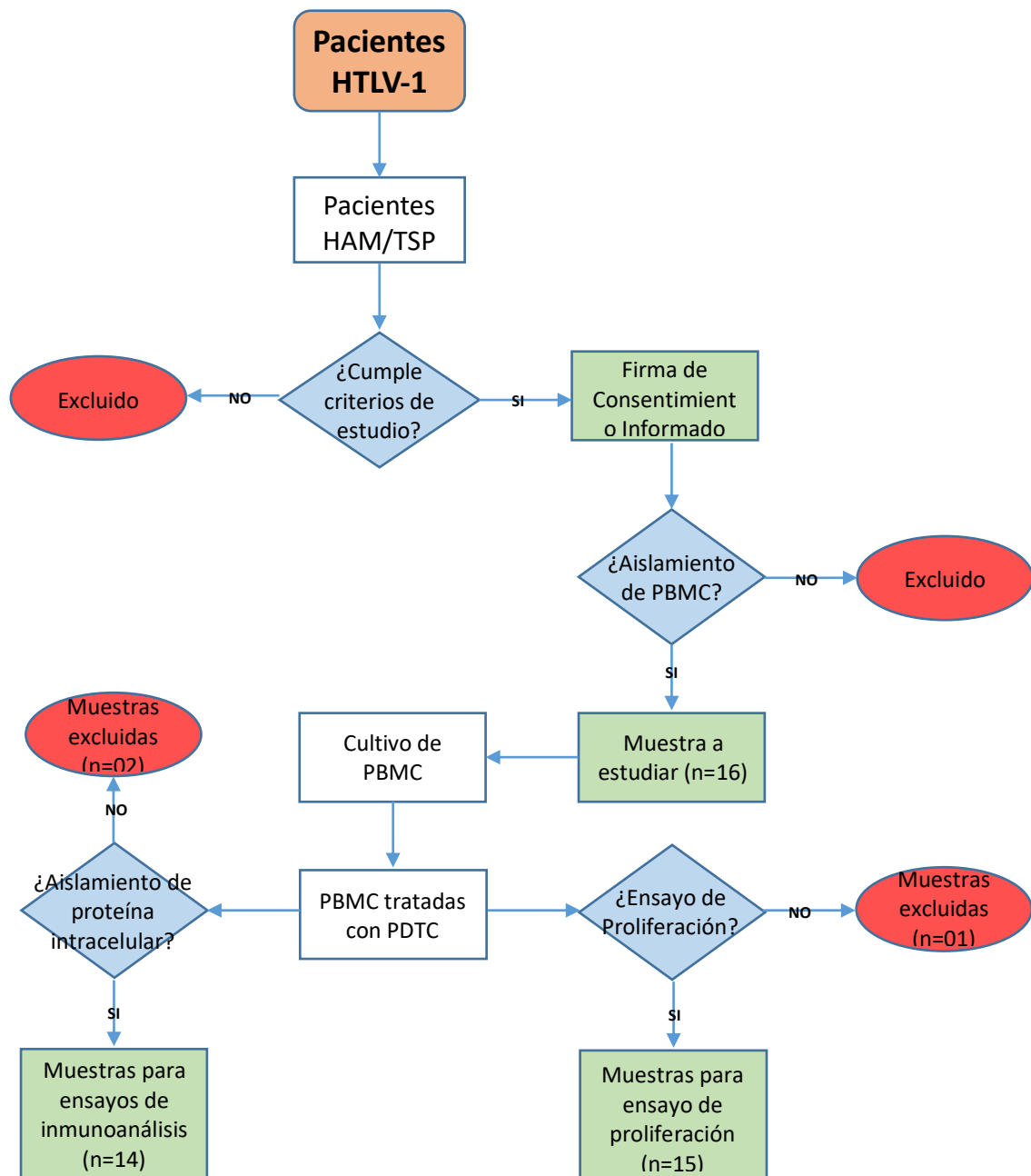
- Pacientes con enfermedades asociadas a HTLV-1 como: PET, ATLL, uveítis, estrongiloidiasis, sarna noruega, dermatitis infectiva.
- Donantes de sangre HTLV-1 seropositivos referidos de los bancos de sangre del país.
- Familiares de personas infectadas con HTLV-1.

Las personas enroladas en la cohorte clínica fueron atendidas y recibieron consejería clínica por un grupo multidisciplinario de expertos en enfermedades asociadas a HTLV-1 del IMT-AvH. El personal de salud se encargó de extraer una muestra de 6 mL de sangre para la confirmación de infección por el método de ELISA (Bioelisa HTLV-I+II versión 5.0 Biokit. España) y la PCR convencional. Las personas confirmadas con infección del HTLV-1 fueron evaluadas por un médico infectólogo y por un médico neurólogo que confirmaba la presencia o no de PET siguiendo los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud (Kaplan *et al.*, 1990).

## **b. MUESTREO**

El tamaño de la muestra utilizada en este estudio se basó en un muestreo no probabilístico por conveniencia a partir de la cohorte de pacientes registrados en el grupo de investigación en HTLV-1 del IMT – AvH.

El muestreo de los pacientes a participar en esta investigación, cuyo flujo se indica en la Figura 9, finalizó con la selección de una muestra final de 16 pacientes HTLV-1 positivos con diagnóstico neurológico de PET que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión del estudio (Anexo II) y que aceptaron el uso de sus muestras biológicas a través de la firma de los consentimientos informados aprobados por el Comité de Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo III). Adicionalmente, para realizar la validación de los resultados se incluyeron ocho muestras de personas no infectadas con HTLV-1.



**Figura 9. Flujograma de las muestras para el estudio.** Se seleccionó pacientes con PET. Luego de la firma del consentimiento informado se dispuso de 16 muestras de sangre con EDTA. Se excluyeron datos durante el proceso.

### **c. MUESTRA**

Las personas seleccionadas para este estudio consintieron conceder 21 mL de sangre periférica. La sangre periférica fue extraída de la región cubital del brazo en tubos Vacutainer™ con anticoagulante EDTA.

La muestra de sangre fue procesada para el aislamiento de PBMC mediante el método de gradiente de Ficoll (Anexo IV). Durante el procesamiento de aislamiento de PBMC se procedió a separar aproximadamente 1 mL de plasma, el cual fue guardado a -20 °C; asimismo, de las PBMC aisladas se separaron aproximadamente  $3 \times 10^6$  de PBMC, las cuales fueron centrifugadas para obtener un pellet celular que fue guardado a -20 °C.

Las PBMC restantes, las cuales representan las muestras biológicas sobre las que se realizaron los experimentos en este estudio, fueron criopreservadas en nitrógeno líquido utilizando 10% de DMSO y en una cantidad máxima de  $10 \times 10^6$  PBMC por cada criovial. La información sobre las muestras y sus procedencias fueron almacenadas por el grupo clínico en una base de datos protegida con contraseña y siguiendo los acuerdos éticos. En el laboratorio, los experimentos se realizaron en ciego utilizando solo códigos de pacientes.

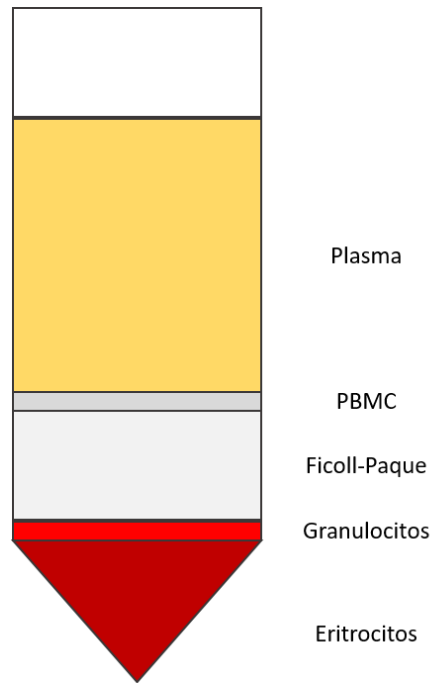
## **2. MÉTODOS**

### **a. AISLAMIENTO DE LAS PBMC**

Las PBMC fueron extraídas a partir de muestras de aproximadamente 18 mL de sangre periférica tomadas en tubos Vacutainer™ mediante el método de gradiente de Ficoll, el cual permite la separación selectiva de las células mononucleares de los eritrocitos y plaquetas.

De manera breve, la sangre periférica es centrifugada para separar las células sanguíneas del plasma, el cual es descartado. Luego, se realiza una mezcla V/V de células sanguíneas con solución de Hank, la cual es trasvasada cuidadosamente a un tubo que contiene Ficoll (en una proporción V/V con la mezcla sanguínea) de manera que dicha mezcla se mantenga por encima del Ficoll. Posteriormente, se realiza una centrifugación que permite separar por gradiente de densidad los componentes celulares de la sangre, como se muestra en la Figura 10; cuidadosamente por aspiración se toma solo la capa que contiene las PBMC para luego ser colocadas en un tubo nuevo, donde se realizarán un par de lavados utilizando solución de Hank. Finalmente, se realizará el conteo del número de PBMC aisladas utilizando el colorante de exclusión azul de tripán sobre una cámara de Neubauer bajo el microscopio.





**Figura 10. Esquema de la gradiente de densidad generada por el Ficoll después de una centrifugación.** De acuerdo al esquema se observa la capa de PBMC sobre la fase del Ficoll-Paque. Diseñado por el autor de esta tesis.

#### **b. CULTIVOS CELULARES**

Las PBMC fueron puestas a cultivo en placas de 96 pocillos con fondo en U, donde se colocaron 250 000 células en cada uno de los pozos. Las PBMC fueron cubiertas con 250  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% del aminoácido L-glutamina y 0.1% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Los cultivos celulares se mantuvieron bajo las mismas condiciones para todos los experimentos, dichas condiciones de cultivo, configuradas en la incubadora de cultivo celular, incluyeron una temperatura de 37 °C y 5% de saturación de CO<sub>2</sub>.

Asimismo, todos los procedimientos que incluyeron la manipulación de células fueron realizadas bajo estrictas condiciones de esterilidad haciendo uso de una cabina de flujo laminar y materiales esterilizados para este propósito.

### **c. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC<sub>50</sub>)**

La estimación de la concentración letal media y la selección de la dosis con la que se realizaron los experimentos se basó en pruebas de citotoxicidad a través de cultivo celular con 5 dosis de PDTC (0, 5, 10, 20 y 40 µM) y durante 3 tiempos de cultivo (24, 48 y 72 horas) (Anexo V).

El cálculo de la LC<sub>50</sub>, que implica la identificación de la concentración de PDTC capaz de generar muerte al 50% de células tratadas, se realizó después de la cosecha de las células, al cumplirse los tiempos de cultivo, mediante el análisis de los datos de exclusión celular utilizando el colorante vital azul de tripán a una proporción de 1:10 (cultivo celular : colorante azul de tripán). El colorante vital fue capaz de teñir de color azul a las células muertas debido a los daños en la membrana celular de dichas células, mientras que las células vivas no fueron teñidas. El conteo diferencial de las células se realizó a través del microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

Los datos del conteo de células vivas y muertas fueron posteriormente analizados utilizando el método Probit en el paquete de Microsoft Excel 2016 para determinar la Concentración Letal Media (LC<sub>50</sub>) para cada uno de los tiempos de incubación.

### **d. ESTIMACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

La proliferación celular de las PBMC tratadas y no tratadas con PDTC fue estimada mediante cultivo celular haciendo uso del trazador fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés), el cual fue incorporado en los PBMC mediante el tratamiento que indica el protocolo del *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit* (BD Horizon™) (Anexo VI).

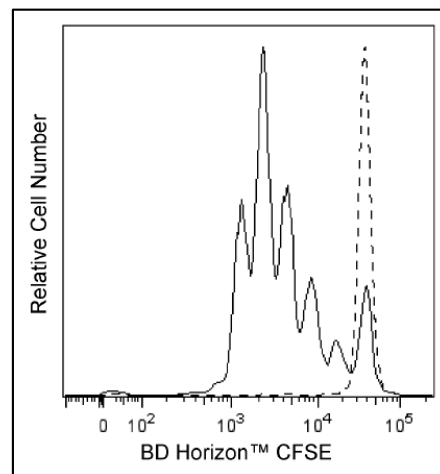
Las moléculas de CFSE son capaces de atravesar la membrana celular con mucha facilidad y, en el interior de la célula, logra formar complejos covalentes de larga duración con los grupos aminos de las proteínas y otras moléculas. De esta manera, cuando la población inicial de células queda completamente marcada con CFSE y entra en proceso de división celular, donde se produce la repartición equitativa de los componentes celulares de la célula madre hacia las células hijas, se produce también una repartición igualitaria de CFSE en las células hijas generándose, de esta manera, una nueva población celular con la mitad de CFSE respecto a la población inicial, y así sucesivamente en cada división celular. Estas características del CFSE permiten utilizarlo como marcador de proliferación celular, ya que permite establecer las distintas poblaciones celulares generadas después de cada división celular, tal como se muestra en la Figura 11.

En esta investigación, posterior al tratamiento con 2  $\mu\text{M}$  de CFSE se obtuvo una población inicial de PBMC completamente marcada. Luego se procedió con la incubación de estas células con 10  $\mu\text{M}$  de PDTC o solo con medio cultivo (para las células no tratadas) por 24 horas a 37 °C y con 5% de  $\text{CO}_2$  y, al término de esta incubación, se reemplazó el sobrenadante del cultivo por un nuevo medio de cultivo suplementado con 5 mg/mL del inductor de proliferación fitohematoglutina (PHA). Se permitió una incubación de 72 horas a condiciones controladas (37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ ) con este medio de cultivo suplementado con PHA para fomentar la proliferación celular de las PBMC tratadas y no tratadas con PDTC.

Al término de la incubación con PHA durante 72 horas, las PBMC fueron cosechadas para la detección y medición de la fluorescencia de CFSE en estas. Se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) con un láser de ion argón (azul 488 nm) y detector

FL que detecta la fluorescencia emitida a 533-30 nm (FL1, detección de CFSE) para la detección de los niveles de fluorescencia de CFSE en cada una de las muestras de PBMC utilizadas.

Los datos generados por el citómetro de flujo fueron posteriormente analizados con el software FCS Express 6 (*DeNovo Software*), el cual permitió identificar las distintas poblaciones celulares originadas por la proliferación celular y, al mismo tiempo, establecer las características de dichas poblaciones para poder realizar las comparaciones entre los tratamientos con PDTC y sin PDTC.



**Figura 11. Análisis por citometría de flujo de la proliferación celular con CFSE.** Cada pico mostrado en la imagen corresponde a una generación celular distinta. Tomado del *Technical Data Sheet* del kit *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation*.

#### **e. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CITOQUINA IFN- $\gamma$**

La medición de la citoquina proinflamatoria interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) se realizó sobre el sobrenadante del cultivo celular de las PBMC tratadas y no tratadas con PDTC y haciendo uso del panel de medición de citoquinas *Th1/Th2 Cytokine 11-Plex Human ProcartaPlex™ Panel* (Invitrogen™).

El panel ProcartaPlex 11-plex humano es un kit de inmunoensayo multiplex preconfigurado que permite la medición de 11 blancos proteicos utilizando

la tecnología *Luminex xMAP*. Estos inmunoensayos preconfigurados están basados en el principio del ELISA tipo sándwich, el cual utiliza dos anticuerpos altamente específicos que se unen a distintos epítomos de una proteína para cuantificar simultáneamente distintos blancos proteicos haciendo uso de un equipo Luminex multiplex que permite la medición de varios analitos al mismo tiempo en un solo pocillo de ensayo a través de conjuntos de perlas magnéticas espectralmente distintas que se conjugan con anticuerpos específicos para cada analito, el cual es reconocido posteriormente por el segundo anticuerpo biotinilados o conjugados con estreptavidina. Las diferencias en color de cada set de perlas magnéticas permiten la identificación y medición de cada analito evaluado. Los paneles preconfigurados del ProcartaPlex se encuentran validados para garantizar la reproducibilidad y la consistencia de los resultados.

En ese sentido, 25  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo celular de PBMC tratadas y no tratadas con PDTC por 24 horas y en condiciones controladas de incubación (37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) fueron añadidos la solución de trabajo que contenía a las perlas magnéticas conjugadas con el primer anticuerpo específico para 11 blancos proteicos, entre ellos la citoquina IFN- $\gamma$ . Después de la incubación correspondiente y el proceso de lavado se agregó la solución de detección que contenía el segundo anticuerpo conjugado con estreptavidina-PE y se dejó incubar para después proceder con el lavado respectivo. Finalmente se agregó la solución de lectura que, después de un tiempo de incubación, permitió adquirir la data resultante de la medición de los niveles de las proteínas blanco utilizando el sistema Luminex.

#### **f. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF- $\kappa$ B**

La activación de la vía NF- $\kappa$ B fue evaluada de dos maneras distintas, una directa y otra indirecta, esto para identificar el posible efecto que tendría la PDTC a lo largo de la vía canónica durante la activación de la vía NF- $\kappa$ B.

Las mediciones se realizaron a partir de las fracciones obtenidas después del procesamiento de las PBMC con el kit PARIS™ (Ambion®), siguiendo la guía del protocolo del kit, el cual permite la separación de las fracciones nuclear y citoplasmática de las células.

La manera de evaluación directa de la activación de esta vía fue a través de la medición de la proteína RelA (p65) en la fracción nuclear de las PBMC tratadas y no tratadas con 10  $\mu$ M PDTC durante 24 horas y a condiciones controladas de incubación (37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>).

Por otro lado, la medición indirecta de la activación de la vía NF- $\kappa$ B se realizó cuantificando los niveles de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada en la fracción citoplasmática de las PBMC tratadas y no tratadas con 10  $\mu$ M PDTC durante 24 horas en condiciones controladas de incubación.

#### **i. Cuantificación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por la proteína RelA (p65) en la fracción nuclear de las PBMC**

La medición de las cantidades de proteína RelA (p65) se realizó a través del kit *TransAM® NF $\kappa$ B Family* (Active Motif®), el cual utiliza un sistema tipo ELISA con placas cubiertas con oligonucleótidos consenso de NF- $\kappa$ B. Las proteínas activadas de la vía NF- $\kappa$ B, entre ellas la proteína p65, son translocadas al núcleo para iniciar la activación de los genes correspondientes. Estas proteínas se unen a los oligonucleótidos consenso ubicados en la placa del kit, para después ser alcanzados por un anticuerpo específico, por lo cual estas proteínas (entre ellas la p65)

se encontrarán unidas tanto al oligonucleótido consenso como al anticuerpo específico. Finalmente, la detección ocurre cuando se añade un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, lo cual permite la generación de color que puede ser medido a través de un espectrofotómetro. Los valores medidos de la proteína RelA (p65) fueron luego transformados en porcentaje de activación de la vía NF- $\kappa$ B utilizando los datos obtenidos de la medición del Raji (muestra de referencia incluida en el kit) que sirvió como normalizador para este experimento.

La activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por la translocación de la proteína RelA (p65) fue cuantificada a partir de la fracción nuclear de las PBMC tratadas y no tratadas con PDTC 10  $\mu$ M obtenida en el procesamiento con el kit PARIST<sup>TM</sup>. Dicha cuantificación fue realizada siguiendo el protocolo del kit *TransAM® NF $\kappa$ B Family (Active Motif®)* que fue explicado anteriormente.

Los datos obtenidos de las mediciones la proteína RelA realizadas en el espectrofotómetro fueron almacenados para su posterior análisis utilizando el software *GraphPad Prism versión 6.0*.

## **ii. Medición de los niveles de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ en la fracción citoplasmática de las PBMC**

La cuantificación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  se realizó utilizando el sistema *I $\kappa$ B alpha (Total/Phospho) Human InstantOne<sup>TM</sup> ELISA Kit*, el cual utiliza una plataforma ELISA tipo sándwich para la detección de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en sus dos formas, fosforilada y no fosforilada, usando anticuerpos específicos. Los anticuerpos específicos a fosfoserina32 y fosfoserina36 de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  son añadidos y acoplados a los pocillos de la placa del kit para luego agregar la fracción citoplasmática conteniendo la

proteína blanco. Posteriormente, después de los lavados respectivos, se añade el segundo anticuerpo conjugado y se realiza la incubación indicada en el protocolo junto con el reactivo de detección que contiene peroxidasa y que da lugar una reacción colorimétrica. Finalmente, se agrega el reactivo de detección que detiene la reacción de la peroxidasa y permite la lectura por espectrofotometría de las muestras analizadas a una longitud de onda de 450 nm.

De esta manera, los niveles de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada, que son un indicativo de la degradación posterior de esta proteína por parte del proteosoma, fueron medidos utilizando el kit mencionado anteriormente y siguiendo el protocolo del fabricante, a partir de la fracción citoplasmática de las PBMC tratadas y no tratadas con 10  $\mu$ M PDTC por 24 horas.

Los datos obtenidos de los niveles de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada fueron expresados en valores de densidad óptica (OD) utilizando como blanco el buffer de dilución de las fracciones citoplasmáticas de las muestras. Estos resultados fueron almacenados en una base de datos y posteriormente analizados.



### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el software *GraphPad Prism versión 6.0*, el cual también permitió realizar los gráficos de resultados para cada uno de los ensayos. La única excepción se tuvo para el cálculo de la concentración letal media (LC50) de la PDTC, el cual fue realizado en el software Excel 2016 utilizando la función Probit.

Debido a la normalidad que presentaron los datos resultantes en la mayoría de los experimentos realizados, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas para comparar los resultados obtenidos entre los grupos analizados (con y sin tratamiento con PDTC 10  $\mu$ M por 24 horas) y evaluar las diferencias. El único set de datos que no cumplió la normalidad fue los resultados de la cuantificación de la citoquina IFN- $\gamma$ , por lo que se utilizó la prueba de Wilcoxon para evaluar las diferencias entre tratamientos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando un nivel de significancia del 5%.

## V. RESULTADOS

### 1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE LA PDTTC

Los datos resultantes en este experimento mostraron que existen diferencias en los valores de la  $LC_{50}$  de PDTTC entre los tiempos de incubación de las PBMC. De esta manera, se evidenció que, con un tiempo de incubación de 24 horas, la concentración letal media fue de 194  $\mu M$ ; mientras que para las 48 horas la  $LC_{50}$  se redujo a 111  $\mu M$ ; así también, la  $LC_{50}$  disminuyó a un valor de 86  $\mu M$  para las 72 horas de incubación. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Análisis y resultados del cálculo de la concentración letal media ( $LC_{50}$ ).** El análisis se realizó utilizando la función Probit en el software Excel 2016 para cada uno de los tiempos de incubación y tomando en consideración todas las concentraciones. Se comprobaron los resultados haciendo uso de una prueba de Chi-cuadrado.

	Concentración		Cél. Vivas	Cél. Muertas	% Mortalidad	Mortalidad Observada	Mortalidad Esperada
	$\mu M$	log				Probit	Probit
24 H	0		194	5	3	3.12	
	5	0.7	164	11	6	3.45	3.47
	10	1.0	157	17	10	3.72	3.76
	20	1.3	149	39	21	4.19	4.05
	40	1.6	130	39	23	4.26	4.34
	RESULTADO					Slope: 0.9634 Intercepto: 2.7966	
						LC50 194 Chi-cuadrado 0.006855	
48	Concentración		Cél. Vivas	Cél. Muertas	% Mortalidad	Mortalidad Observada	Mortalidad Esperada
	$\mu M$	log				Probit	Probit
	0		183	12	6	3.45	
	5	0.7	159	19	11	3.77	3.76
	10	1.0	153	30	16	4.01	4.04
	20	1.3	129	42	25	4.33	4.31
	40	1.6	110	56	34	4.59	4.59
	RESULTADO					Slope: 0.9235 InterceptO: 3.1125	
						LC50 111 Chi-cuadrado 0.000266	
72	Concentración		Cél. Vivas	Cél. Muertas	% Mortalidad	Mortalidad Observada	Mortalidad Esperada
	$\mu M$	log				Probit	Probit
	0		171	19	10	3.72	
	5	0.7	157	29	16	4.01	3.97
	10	1.0	142	37	21	4.19	4.22
	20	1.3	124	49	28	4.42	4.47
	40	1.6	102	70	41	4.77	4.72
	RESULTADO					Slope: 0.8338 InterceptO: 3.3882	
						LC50 86 Chi-cuadrado 0.001701	

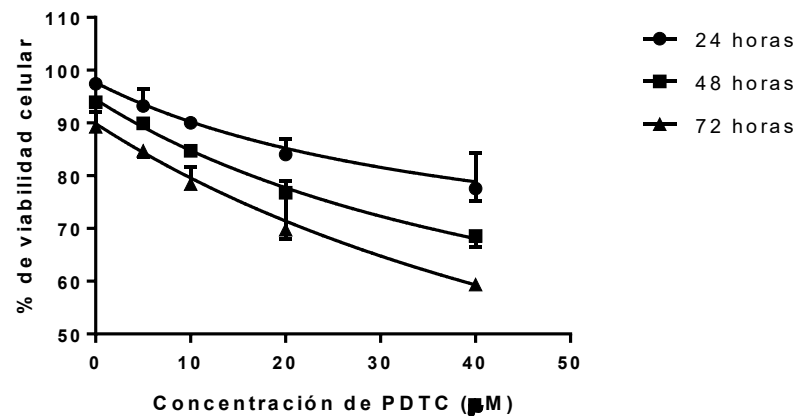
Estos resultados también indican que las  $LC_{50}$  calculadas fueron superiores a las concentraciones utilizadas para este experimento, ya que la máxima concentración utilizada en el cálculo de la  $LC_{50}$  fue de 40  $\mu M$  mientras que el mínimo valor de  $LC_{50}$  detectado fue de 86  $\mu M$ .

Asimismo, los resultados obtenidos también permitieron establecer la concentración de trabajo para los experimentos posteriores. En este sentido, respecto a los tiempos de incubación se observó que, a 24 horas de incubación, la viabilidad celular de las PBMC se reduce hasta 80% en la concentración de máximo valor (40  $\mu M$ ); mientras que en los tiempos de incubación 48 y 72 horas, la viabilidad celular se reduce hasta aproximadamente 60% en la máxima concentración de PDTC analizada (40  $\mu M$ ). Por lo tanto, se consideró utilizar un tiempo de incubación de 24 horas, debido a que a este tiempo los efectos de la PDTC no eran lo suficientemente tóxicos para generar interferencia con los procesos celulares que fueron evaluados en los demás experimentos.

De la misma manera, respecto a las concentraciones de PDTC, se observó una relación de dosis dependencia con reducción de la viabilidad celular en todos los tiempos de incubación evaluados. Además, los resultados mostraron que la concentración de 10  $\mu M$ , a las 24 horas de incubación, mantuvo un porcentaje de viabilidad celular de aproximadamente 90%. Esta pequeña variación en la viabilidad celular entre la concentración blanco (0  $\mu M$ ) y la concentración de 10  $\mu M$  de PDTC indicaría que esta concentración podría generar efectos medibles en los experimentos posteriores, pero sin producir interferencias provocadas por la citotoxicidad de la PDTC.

Los resultados de este experimento permitieron establecer la concentración de PDTC y el tiempo de incubación del cultivo celular a utilizarse en los

experimentos subsiguientes, los cuales fueron de 10  $\mu$ M y 24 horas, respectivamente. En la Figura 12 se muestra la curva de citotoxicidad analizada con las variables concentración y tiempo de incubación que fueron usadas en este ensayo.



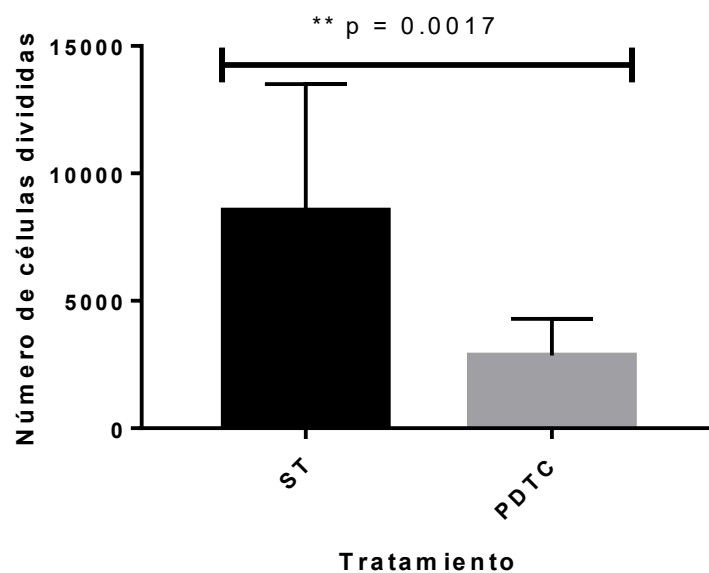
**Figura 12. Gráfico dosis respuesta de PBMC.** El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante el cálculo porcentual de las células muertas en el conteo por exclusión con azul de Tripán. Ensayo realizado por triplicado.

## 2. PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS PBMC TRATADAS CON PDTC

Los efectos del tratamiento con 10  $\mu$ M de PDTC por 24 horas sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B en células de pacientes con PET permitieron evidenciar resultados relevantes sobre la proliferación celular, una de las principales características de células donde la vía NF- $\kappa$ B se encuentra activa.

Los análisis comparativos de la proliferación celular entre las PBMC de pacientes con PET tratadas y no tratadas con PDTC se muestran en la Figura 13. Se evidenció una reducción estadísticamente significativa en el número de células mitóticas ( $p = 0.0017$ ) en aquellas células tratadas con 10  $\mu$ M de PDTC durante 24 horas. El número de células divididas en las muestras tratadas con PDTC tuvo una media de 2858 células (DE = 1438), mientras que las muestras no tratadas con el antioxidante mostraron una media de 8542 células divididas (DE = 4968).

Estos resultados revelaron que el tratamiento con PDTC es capaz de reducir la proliferación celular en las PBMC de pacientes con PET, probablemente a través de la modulación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B y la disminución de sus efectos sobre estas células. Esta reducción mayor al 60% en comparación con las PBMC no tratadas demostró la capacidad de la PDTC para disminuir la proliferación en células infectadas con HTLV-1, que además estuvieron inducidas a proliferar a través de la influencia de la fitohemaglutinina (PHA).



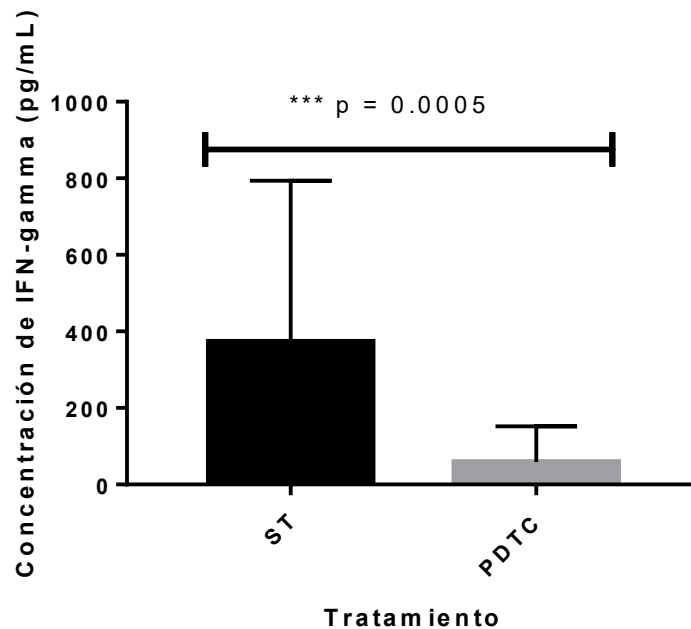
**Figura 13. Análisis de proliferación celular mediante citometría usando CFSE.** Los valores representan el número de células en división medidas por citometría después de 72 horas exposición al inductor de proliferación fitohemaglutinina (PHA), previo tratamiento (o no) con PDTC 10  $\mu$ M por 24 horas. ST: Sin Tratamiento (n = 14); PDTC: Tratamiento con PDTC (n = 14). La data fue analizada con la prueba t para muestras pareadas.

### 3. NIVELES DE EXRESIÓN DE LA CITOQUINA INF- $\gamma$ EN PBMC TRATADAS CON PDTC.

Al producirse la activación de la vía NF- $\kappa$ B se activa también la actividad proinflamatoria de las PBMC, específicamente sobre la expresión de muchas moléculas, sobre todo citoquinas con gran capacidad de generar respuestas inflamatorias en estas células, como la citoquina interferón gamma (IFN- $\gamma$ ),

cuya función más importante es la de activar a los macrófagos para la correcta eliminación de las células infectadas. Sin embargo, si su expresión es exacerbada, como ocurre en pacientes con PET, es posible que se genere daño al propio organismo.

Los resultados de las mediciones sobre las cantidades de la citoquina IFN- $\gamma$  expresadas por las PBMC de pacientes con PET tratadas y no tratadas con PDTC, que se muestran en la Figura 14, revelaron una reducción de más del 75% en la concentración de la citoquina IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de las células tratadas con PDTC respecto a las muestras sin tratamiento ( $p = 0.0005$ ). Los resultados indicaron que la concentración de IFN- $\gamma$  en las células de pacientes con PET no tratadas mostró una mediana de 372.50 pg/mL (CV = 79.46%), mientras que las PBMC tratadas con 10  $\mu$ M de PDTC por 24 h presentaron una mediana de 28.74 pg/mL (CV = 171.33%). Esto demuestra la capacidad de este antioxidante para reducir la promoción de la inflamación mediada por IFN- $\gamma$ , probablemente a través de la reducción de la activación de la vía NF- $\kappa$ B en las células tratadas.



**Figura 14. Análisis de la expresión de la citoquina IFN- $\gamma$ .** Los valores representan la concentración (pg/mL) de la citoquina IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo de PBMC de pacientes con PET tratadas o no con 10  $\mu$ M de PDTC por 24 horas. ST: Sin Tratamiento (n = 12); PDTC: Tratamiento con PDTC (n = 12). El análisis de los datos se realizó utilizando la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

#### 4. ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF- $\kappa$ B

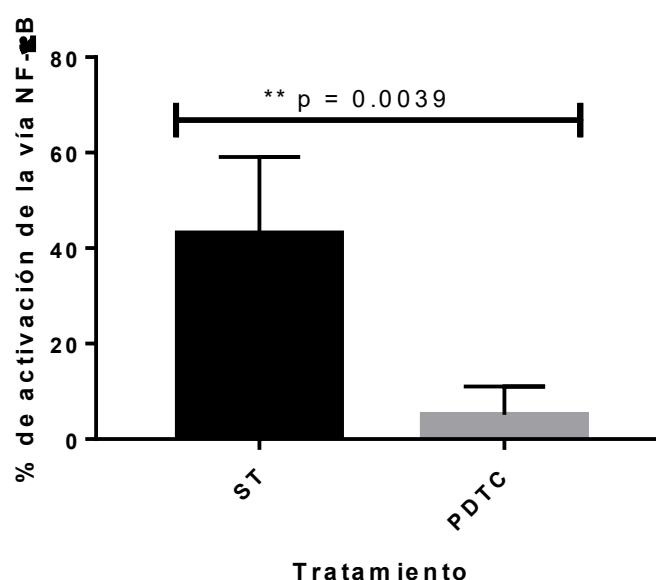
##### a. Activación de la vía NF- $\kappa$ B por translocación de RelA al núcleo

La cuantificación de la proteína RelA (p65) en la fracción nuclear de las PBMC permitió evidenciar la translocación de esta proteína al núcleo y, por lo tanto, sería indicativo directo de la activación de la vía NF- $\kappa$ B en las células los pacientes con PET analizadas bajo el tratamiento, o no, de 10  $\mu$ M de PDTC por 24 horas.

Como se observa en la Figura 15, los resultados de estas mediciones mostraron una reducción significativa en la activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por la translocación de la proteína RelA en las células de pacientes PET tratadas con PDTC en comparación con las PBMC sin tratamiento ( $p = 0.0039$ ). Los resultados indicaron que las PBMC tratadas presentaron un

porcentaje promedio de activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por RelA del 5.097% (DE = 5.924), mientras que las muestras no tratadas con PDTC mantuvieron un porcentaje de activación del 43.130% (DE = 16). Todos estos resultados fueron obtenidos respecto de los valores del Raji que sirvió como un normalizador en este experimento.

Estos resultados indicarían que la translocación de RelA hacia el núcleo de las células de pacientes con PET tratadas con PDTC, la cual se corresponde directamente con una modulación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B a través de la vía canónica, es afectada de manera significativa por el tratamiento con este antioxidante.



**Figura 15. Porcentaje de activación de la vía NF- $\kappa$ B.** Los valores indican el porcentaje de activación de la vía NF- $\kappa$ B respecto al raji del kit utilizado para la cuantificación. ST: Sin Tratamiento (n = 6); PDTC: Tratamiento con PDTC (n =6). El análisis de los datos se realizó utilizando la prueba t para muestras pareadas.

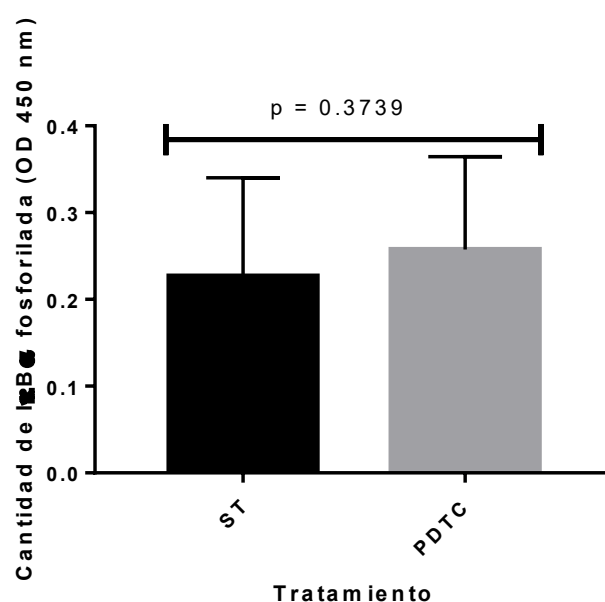
#### **b. Cuantificación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ fosforilada**

Al cuantificar la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada en la fracción citoplasmática de las PBMC tratadas y no tratadas con PDTC se evaluó si este antioxidante



mediaba sus efectos sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B a través de esta proteína, la cual es su inhibidor natural.

Los resultados, que son mostrados en la Figura 16, no muestran diferencia significativa ( $p = 0.3739$ ) de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada en las células tratadas con PDTC en comparación con las células no tratadas. Estos resultados mostraron que las PBMC tratadas con PDTC tuvieron una media de OD, correspondiente a la cantidad de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada, de 0.2267 (DE = 0.1134), mientras que la OD promedio en las células no tratadas con PDTC fue de 0.2573 (DE = 0.1071), esto supone una diferencia mínima, aunque no significativa, en la cantidad de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada entre los dos tratamientos.



**Figura 16. Cuantificación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada.** Los valores indican desviación óptica (OD) medida a una longitud de onda de 450 nm, la cual es directamente proporcional a la cantidad de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada en PBMC de pacientes con PET tratadas y no tratadas con PDTC. ST: Sin Tratamiento ( $n = 15$ ); PDTC: Tratamiento con PDTC ( $n = 15$ ). La data se analizó utilizando la prueba t para muestras pareadas.

## VI. DISCUSIÓN

HTLV-1 está ampliamente extendido a nivel mundial, se estima que alrededor de 10 millones de personas están infectadas, aunque la mayoría de estas son asintomáticas (Gessain & Cassar, 2012). Una de las enfermedades asociada a HTLV-1 más recurrente y de gran relevancia es la paraparesia espástica tropical (PET), la cual está caracterizada por la rigidez de los miembros inferiores acompañada de parálisis progresiva con subsecuentes alteraciones sensoriales y del sistema urinario (Gotuzzo *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de los diversos estudios realizados sobre la PET, en la actualidad no se cuenta con un tratamiento estandarizado para esta enfermedad. En este estudio se investigaron los efectos del antioxidante pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B, la cual se encuentra sobreactivada en pacientes con PET y estaría implicada en la patogénesis de esta enfermedad (Grassman *et al.*, 2005).

Inicialmente se realizaron ensayos de citotoxicidad celular para identificar la concentración letal media de la PDTC sobre las células mononucleares de sangre periférica. Dichos ensayos mostraron que la LC<sub>50</sub> varió de manera significativa en cada tiempo de incubación, reduciéndose a medida que se prolongaba el tiempo de cultivo de las PBMC tratadas con PDTC (Tabla 1; Figura 12). Este resultado indicaría la importancia del factor tiempo sobre los efectos de la PDTC en las células analizadas, ya que promovería una mayor exposición al antioxidante y, a la vez, reduciría los componentes nutricionales presentes en el medio de cultivo. En la misma línea, también se detectó que las LC<sub>50</sub> encontradas superaban en gran medida a las dosis utilizadas para este ensayo, ya que ninguna de las concentraciones ensayadas redujo la viabilidad celular a menos de 60%. Por lo tanto, cualquiera de las dosis analizadas podría haber sido usada como concentración de trabajo para los demás experimentos.

Sin embargo, el análisis de las curvas de citotoxicidad permitió establecer una concentración de PDTC adecuada para los experimentos subsiguientes. Se seleccionó la concentración de 10  $\mu$ M y el tiempo de incubación de 24 horas, que presentaron una viabilidad celular de 90%, la cual es suficiente para poder encontrar alguna diferencia respecto al no tratamiento con PDTC, pero sin desmedro de la viabilidad celular que podría interferir con otros efectos sobre las células. Existen estudios que han utilizado concentraciones de PDTC similares a la utilizada en esta investigación en estirpes celulares de distinto origen, lo cual indicaría que las dosis cercanas a 10  $\mu$ M de PDTC generan los efectos de modulación de la activación de la vía NF- $\kappa$ B y de sus procesos celulares posteriores sin la reducción de la viabilidad celular. Por ejemplo, Gaudermack *et al.* (2002) indicaron que las concentraciones de PDTC menores o iguales a 15  $\mu$ M mejoran de manera significativa la supervivencia celular en células HeLa infectadas con rinovirus humano, al tiempo que reduce los efectos citopáticos. En la misma línea, Krakauer & Buckley (2008) demostraron que dosis tan bajas como aquellas menores de 1  $\mu$ M pueden generar efectos de inactivación de la vía NF- $\kappa$ B en células mononucleares de sangre periférica inducidos a generar actividad proinflamatoria mediada por exotoxinas superantigénicas de estafilococos.

En contraste, también se han descrito dosis mayores de PDTC utilizadas no solo en líneas celulares cancerígenas sino también en animales de laboratorio, como ratones. De esta manera, Morais *et al.* (2006) utilizaron dosis entre 25 y 100  $\mu$ M de PDTC para identificar los efectos antiproliferativos de este antioxidante sobre líneas celulares de carcinoma de células renales. Asimismo, Gu *et al.* (2009) utilizaron tratamientos de PDTC entre 100 y 200 mg/kg administrados oralmente en ratones con cáncer de mama que mostraron efectos de la vía NF- $\kappa$ B activada. Asimismo, Cuzzocrea *et al.* (2002) administraron intraperitonealmente entre 10 y 100 mg/kg de PDTC en ratones en los que se indujo artritis mediada por colágeno y que

presentaron procesos inflamatorios que han sido asociados con la activación la vía NF- $\kappa$ B.

Estos datos indican que las dosis de PDTC que generarían los efectos sobre la vía NF- $\kappa$ B dependen posiblemente de dos factores. Primero, el tipo de muestra sobre la que se realiza el estudio, células de distintas extirpes o animales de experimentación, podría tener variables externas no controladas que terminen afectando los efectos de la PDTC sobre la vía NF- $\kappa$ B; además, cada tipo de muestra presentaría una potencia distinta de la vía NF- $\kappa$ B y sus efectos, mediada por la forma de activación y el factor activador de esta vía, y esta diferencia derivaría en las divergencias de concentraciones de PDTC que han sido utilizadas en los diversos estudios.

Por otro lado, utilizando la concentración de 10  $\mu$ M de PDTC se observó una reducción significativa de la proliferación celular en células tratadas con este antioxidante durante 24 horas. Esta inhibición de la proliferación celular, que en este estudio fue de más de 50%, ha sido reportada en diversas investigaciones con diferentes tipos celulares (Schreck *et al.*, 1992; Arima *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2006). Es posible que esta reducción en la proliferación provocada por el tratamiento con PDTC esté vinculada con la menor expresión de genes anti-apoptóticos o relacionados con la proliferación celular que están asociados con la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Morais *et al.* (2006), demostraron que, en líneas celulares de carcinoma de células renales, la PDTC ejerce efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos; a través de la reducción de la unión de las subunidades de NF- $\kappa$ B al ADN, mediada por la PDTC, en este estudio se observó la disminución de la expresión de los genes Bcl-2 y Bcl-XL que conllevó a un incremento de la apoptosis y, en consecuencia, a la reducción de la proliferación estas células. Asimismo, Arima *et al.* (2004) mostraron que la PDTC es capaz de inducir apoptosis en células ATLL (leucemia/linfoma de células T del adulto, por sus siglas en inglés), las cuales

también son células infectadas con HTLV-1 y que son altamente proliferativas, y que este efecto estaría mediado posiblemente por sus efectos sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B, específicamente sobre la proteína p53; asimismo, demostraron que la proteína viral Tax es capaz de reducir la apoptosis mediada por la PDTC, aunque no reduce los efectos de este antioxidante sobre la detención del ciclo celular en la fase G1, lo cual también tiene implicancia en la inhibición de la proliferación celular.

De esta manera, es posible inferir que el antioxidante PDTC tiene efectos marcados sobre la proliferación celular, tanto en células inducidas a proliferar artificialmente, como en este estudio donde se utilizó el inductor de proliferación fitohemaglutinina, como en células espontáneamente proliferantes, como las líneas celulares derivadas de estirpes cancerígenas. Este efecto antiproliferativo de la PDTC estaría mediado básicamente por la inducción a apoptosis de las células dañadas o infectadas, evitando, de esta manera, su progreso en el ciclo celular.

Por otra parte, en este estudio también se evidenció la reducción de más del 75% de la expresión de la citoquina interferón gamma en las células tratadas con 10  $\mu$ M de PDTC. Este hecho resulta de gran importancia, sobre todo por la relevancia que suscita para la patogénesis de la paraparesia espástica tropical, donde, según se informó previamente, se produce una expresión crónica de citoquinas proinflamatorias mediada por la activación de la vía NF- $\kappa$ B que, finalmente, terminan generando lesiones irreversibles en las zonas de la médula espinal donde se producen las infiltraciones de linfocitos infectados. En ese sentido, la reducción de la expresión de IFN- $\gamma$  en PBMC de pacientes con PET provocada por el tratamiento con PDTC sería indicativo de la capacidad de este antioxidante para reducir la respuesta inflamatoria de estas células. Esta propiedad de la PDTC ha sido descrita anteriormente por Krakauer & Buckely (2008), quienes demostraron la potencia del antioxidante PDTC para atenuar, incluso en concentraciones micromolares, la producción de citoquinas proinflamatorias, como interferón gamma, en células T

inducidas por superantígenos de estafilococos; asimismo, indicaron que la PDTC redujo la activación de la vía NF- $\kappa$ B de manera correlacionada a la desregulación de las citoquinas proinflamatorias, entre ellas IFN- $\gamma$ . En el mismo sentido, Wan *et al.* (2018) reportaron que el tratamiento con PDTC inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, entre las que destaca IFN- $\gamma$ , a través de la reducción de la activación de vía NF- $\kappa$ B en células con disfunción mitocondrial mediada por deoxinivalenol (DON).

En los párrafos anteriores se manifestó la capacidad del antioxidante PDTC para reducir de manera significativa la proliferación celular y la expresión de citoquinas proinflamatorias en células de pacientes con PET. Tanto la proliferación celular como la expresión de citoquinas son efectos característicos de la activación de la vía NF- $\kappa$ B. En ese sentido, se podría deducir que en estas células de pacientes PET también debería existir una reducción de la activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por el tratamiento con PDTC. Para demostrar este hecho, se realizó un análisis comparativo sobre las cantidades de la subunidad RelA translocadas al núcleo, lo cual representa de manera directa la activación de la vía NF- $\kappa$ B, entre las células de los pacientes PET tratadas y no tratadas con PDTC. Los resultados demostraron que, tal como se esperaba, se produjo una reducción significativa de la activación de la vía NF- $\kappa$ B mediada por la translocación de RelA al núcleo. Este resultado se corresponde con la investigación descrita por Krakauer & Buckley (2008), donde demostraron que las células T inducidas con superantígenos de estafilococos que fueron tratadas con el antioxidante PDTC reducían la cantidad de la subunidad p65 (RelA) liberada, lo cual está directamente relacionado con la disminución de activación de la vía NF- $\kappa$ B; sin embargo, los autores no llegaron a determinar la manera como la PDTC actuaría para generar la reducción de la activación de esta vía celular.

En este estudio se pretendió entender la manera como el antioxidante PDTC genera sus efectos sobre la vía NF- $\kappa$ B, para ello se evaluó la cantidad de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada que indica el marcaje de esta proteína para su posterior degradación por parte del proteosoma, lo que, a su vez, implica la liberación de las subunidades de NF- $\kappa$ B (p50 y RelA (p65)) para su posterior translocación al núcleo con la subsecuente activación de los genes asociados a esta vía celular. Nuestros resultados indicaron que no se presentaron diferencias significativas en los niveles de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada entre células de pacientes con PET que fueron tratadas y no tratadas con 10  $\mu$ M de PDTC durante 24 horas. Estos resultados implicarían que el antioxidante pirrolidina ditiocarbamato ejerce sus efectos de reducción de la activación de la vía NF- $\kappa$ B posiblemente en una posición *downstream* (rio abajo) del punto de secuestro de las subunidades de NF- $\kappa$ B por parte de las proteínas de la familia I $\kappa$ B en la cascada de activación de la vía NF- $\kappa$ B.

Finalmente, los resultados presentados en este estudio demuestran la capacidad del antioxidante pirrolidina ditiocarbamato para reducir la activación de la vía NF- $\kappa$ B y sus efectos celulares, específicamente la proliferación celular y la producción de la citoquina IFN- $\gamma$ , en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con paraparesia espástica tropical. La forma como la PDTC logra ejercer sus efectos sobre la vía NF- $\kappa$ B aún no ha sido esclarecida; sin embargo, en este estudio se ha podido demostrar que dichos efectos no se encuentran relacionados con la fosforilación y degradación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , aunque es posible inferir que la PDTC actúe *downstream* a este punto en la cascada de activación de la vía NF- $\kappa$ B. Se requieren mayores estudios para dilucidar la forma precisa de actuación de este antioxidante.

## VII. CONCLUSIONES

- La concentración letal media de la PDTC sobre las células mononucleares de sangre periférica fue variable respecto al tiempo de incubación, siendo mayor a las 24 horas (194  $\mu$ M) y reduciéndose a las 48 (111  $\mu$ M) y 72 horas (86  $\mu$ M). Asimismo, la concentración de 10  $\mu$ M por 24 h fue utilizada en los experimentos debido a que mantuvo una alta viabilidad celular (90%).
- La pirrolidina ditiocarbamato fue capaz de reducir la proliferación celular, en más del 60%, de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes PET inducidas por el inductor de proliferación fitohematoglutina (PHA).
- El tratamiento con la PDTC mostró una reducción mayor al 75% en la concentración de la citoquina IFN- $\gamma$  expresada por las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con paraparesia espástica tropical.
- El tratamiento con la PDTC logró reducir aproximadamente un 40% de la activación de la vía NF- $\kappa$ B en las células de sangre periférica de pacientes con PET, lo cual demostraría que los efectos de este antioxidante sobre la proliferación celular y la expresión de la citoquina IFN- $\gamma$  están mediados por su influencia sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B.
- La reducción de la activación de la vía NF- $\kappa$ B por parte de la PDTC no se produciría a través de la modulación de la fosforilación y posterior degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma.
- La acción de la PDTC podría ocurrir *downstream* de la etapa de fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , ya que interviene en la modulación de los procesos ulteriores de la vía NF- $\kappa$ B como la proliferación celular, la actividad proinflamatoria y la propia reactivación de la vía NF- $\kappa$ B.



## RECOMENDACIONES

- Como se indicó en los procedimientos, las PBMC utilizadas en los experimentos de este estudio fueron previamente criopreservadas. El proceso de criopreservación-descriopreservación puede inducir estrés en las células, lo cual podría generar variaciones a nivel fisiológico celular provocando algunas interferencias en los resultados. Pese a todas las medidas tomadas para que la influencia de estas interferencias sea mínima, no se descarta la presencia de estas. Por esta razón, se recomienda realizar los experimentos utilizando muestras celulares recién aisladas o, en su defecto, aquellas que no hayan sido expuestas al proceso de criopreservación.
- Para corroborar los efectos más específicos de la PDTC sobre la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  se recomienda realizar las mediciones no solo con la proteína fosforilada, sino también con la fracción no fosforilada. De esta manera podrían evaluarse diferencias a nivel de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  total presente en las células tratadas o no con PDTC.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alva, I. E., Orellana, E. R., Blas, M. M., Bernabe-Ortiz, A., Cotrina, A., Chiappe, M., ... & Montano, S. M. (2012). HTLV-1 and-2 infections among 10 indigenous groups in the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(5), 954-956.
- Araujo, A. Q., & Silva, M. T. T. (2006). The HTLV-1 neurological complex. *The Lancet Neurology*, 5(12), 1068-1076.
- Arima, N., Arimura, K., Tokito, Y., Sakaki, Y., Matsushita, K., Orihara, K., ... & Tei, C. (2004). HTLV-I Tax protein inhibits apoptosis induction but not G1 arrest by pyrrolidinedithiocarbamate, an anti-oxidant, in adult T cell leukemia cells. *Experimental hematology*, 32(2), 195-201.
- Bangham, C. R., Araujo, A., Yamano, Y., & Taylor, G. P. (2015). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15012.
- Bangham, C. R. (2018). Human T cell leukemia virus type 1: persistence and pathogenesis. *Annual review of immunology*, 36, 43-71.
- Barnes, P. J., & Karin, M. (1997). Nuclear factor- $\kappa$ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England journal of medicine*, 336(15), 1066-1071.
- Blas, M. M., Alva, I. E., García, P. J., Cárcamo, C., Montano, S. M., Mori, N., ... & Zunt, J. R. (2013). High prevalence of human T-lymphotropic virus Infection in Indigenous Women from the Peruvian Amazon. *PloS one*, 8(9), e73978.
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), 280-288.
- Boxus, M., Twizere, J. C., Legros, S., Dewulf, J. F., Kettmann, R., & Willems, L. (2008). The HTLV-1 tax interactome. *Retrovirology*, 5(1), 76.

- Carneiro-Proietti, A. B. F., Catalan-Soares, B., & Proietti, F. A. (2002). Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *Journal of biomedical science*, 9(6), 587-595.
- Carpentier, A., Barez, P. Y., Hamaidia, M., Gazon, H., De Brogniez, A., Perike, S., ... & Willems, L. (2015). Modes of human T cell leukemia virus type 1 transmission, replication and persistence. *Viruses*, 7(7), 3603-3624.
- Castro-Costa, C. M. D., Araújo, A. Q., Barreto, M. M., Takayanagui, O. M., Sohler, M. P., Silva, E. L. D., ... & Taylor, G. P. (2006). Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Research & Human Retroviruses*, 22(10), 931-935.
- Cook, L. B., Rowan, A. G., Melamed, A., Taylor, G. P., & Bangham, C. R. (2012). HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood*, 120(17), 3488-3490.
- Curis, C., Percher, F., Jeannin, P., Montange, T., Chevalier, S. A., Seilhean, D., ... & Afonso, P. V. (2016). Human T-lymphotropic virus type 1-induced overexpression of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) facilitates trafficking of infected lymphocytes through the blood-brain barrier. *Journal of virology*, 90(16), 7303-7312.
- Curren, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., ... & Kashanchi, F. (2012). HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Frontiers in microbiology*, 3, 406.
- Cuzzocrea, S., Chatterjee, P. K., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Britti, D., ... & Thiemermann, C. (2002). Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *British journal of pharmacology*, 135(2), 496-510.
- Daenke, S. U. S. A. N., Nightingale, S. I. M. O. N., Cruickshank, J. K., & Bangham, C. R. (1990). Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus

type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. *Journal of virology*, 64(3), 1278-1282.

- Daisley, H., Charles, W., & Suite, M. (1993). Crusted (Norwegian) scabies as a pre-diagnostic indicator for HTLV-1 infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 295-295.
- De las Casas, C., Gotuzzo, E., Deza, L., Cabrera, J., Castañeda, C., & Watts, D. (1996). Características epidemiológicas de los pacientes con paraparesia espástica tropical (PET) asociada a infección por HTLV-1 en Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*, 7(2), 68-74.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., Castro-Amarante, M. F. D., Buchmann, C., Pise-Masison, C. A., & Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*, 3(6), 861-885.
- Fochi, S., Mutascio, S., Bertazzoni, U., Zipeto, D., & Romanelli, M. G. (2018). HTLV deregulation of the NF-κB pathway: an update on Tax and antisense proteins role. *Frontiers in microbiology*, 9, 285.
- Franchini, G. (1995). Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*, 86(10), 3619-3639.
- Fujino, T., & Nagata, Y. (2000). HTLV-I transmission from mother to child. *Journal of reproductive immunology*, 47(2), 197-206.
- Fujiyoshi, T., Li, H. C., Lou, H., Yashiki, S., Karino, S., Zaninovic, V., ... & Tajima, K. (1999). Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. *AIDS research and human retroviruses*, 15(14), 1235-1239.
- Gallo, R. C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, 2(1), 17.

- Gaudernak, E., Seipelt, J., Triendl, A., Grassauer, A., & Kuechler, E. (2002). Antiviral effects of pyrrolidine dithiocarbamate on human rhinoviruses. *Journal of virology*, 76(12), 6004-6015.
- Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., & Mesnard, J. M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *Journal of virology*, 76(24), 12813-12822.
- Gessain, A., Vernant, J. C., Maurs, L., Barin, F., Gout, O., Calender, A. D., & De The, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet*, 326(8452), 407-410.
- Gessain, A., & Cassar, O. (2012). Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in microbiology*, 3, 388.
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16(1), 225-260.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *cell*, 109(2), S81-S96.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680.
- Goncalves, D. U., Proietti, F. A., Barbosa-Stancioli, E. F., Martins, M. L., Ribas, J. G., Martins-Filho, O. A., ... & Carneiro-Proietti, A. B. (2008). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 7(2), 98-107.
- Gotuzzo, E., Cabrera, J., Deza, L., Verdonck, K., Vandamme, A. M., Cairampoma, R., ... & De las Casas, C. (2004). Clinical characteristics of patients

in Peru with human T cell lymphotropic virus type 1—associated tropical spastic paraparesis. *Clinical infectious diseases*, 39(7), 939-944.

- Gotuzzo, E., Verdonck, K., González, E., & Cabada, M. (2004). Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1): una infección endémica en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 21(4), 253-260.
- Grassmann, R., Aboud, M., & Jeang, K. T. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene*, 24(39), 5976.
- Gu, J. W., Young, E., Busby, B., Covington, J., & Johnson, J. W. (2009). Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. *Cancer biology & therapy*, 8(6), 514-521.
- Harhaj, E. W., Good, L., Xiao, G., Uhlik, M., Cvijic, M. E., Rivera-Walsh, I., & Sun, S. C. (2000). Somatic mutagenesis studies of NF- $\kappa$ B signaling in human T cells: evidence for an essential role of IKK $\gamma$  in NF- $\kappa$ B activation by T-cell costimulatory signals and HTLV-I Tax protein. *Oncogene*, 19(11), 1448.
- Harhaj, E. W., & Harhaj, N. S. (2005). Mechanisms of persistent NF- $\kappa$ B activation by HTLV-I Tax. *IUBMB life*, 57(2), 83-91.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362.
- Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., ... & Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*, 299(5613), 1713-1716.
- Iwasaki, Y. (1993). Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. *Brain Pathology*, 3(1), 1-10.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y. K., Bertolette, D. C., & Ruscetti, F. W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature medicine*, 14(4), 429.

- Karin, M. (1999). How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18(49), 6867.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J. I., Iwamasa, T., ... & Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 196(1), 25-33.
- Krakauer, T., & Buckley, M. (2008). The Potency of Anti-Oxidants in Attenuating Superantigen-Induced Proinflammatory Cytokines Correlates with Inactivation of NF- $\kappa$ B. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 30(1), 163-179.
- Lagrenade, L., Hanchard, B., Fletcher, V., Cranston, B., & Blattner, W. (1990). Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet (British edition)*, 336(8727), 1345-1347.
- Larson, C. J., & Taswell, H. F. (1988, September). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) and blood transfusion. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 63, No. 9, pp. 869-875). Elsevier.
- Lezin, A., Olindo, S., Olié, S., Varrin-Doyer, M., Marlin, R., Cabre, P., ... & Cesaire, R. (2005). Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *The Journal of infectious diseases*, 191(11), 1830-1834.
- Li, Q., & Verma, I. M. (2002). NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature reviews immunology*, 2(10), 725.
- Liu, S. F., Ye, X., & Malik, A. B. (1999). Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*, 100(12), 1330-1337.
- Maloney, E. M., Cleghorn, F. R., Morgan, O. S., Rodgers-Johnson, P., Cranston, B., Jack, N., ... & Manns, A. (1998). Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and

Trinidad. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association*, 17(2), 167-170.

- Martins, J. V. P., Baptista, A. F., & Araújo, A. D. Q. C. (2012). Quality of life in patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 70(4), 257-261.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., & Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS pathogens*, 6(2), e1000788.
- McCormick, M., Oh, U., Datta, D., Turner, R., Bobb, K., Monie, D., ... & Jacobson, S. (2011, December). NFkB activation promotes immune activation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. In *Retrovirology* (Vol. 8, No. S1, p. A117). BioMed Central.
- Morais, C., Pat, B., Gobe, G., Johnson, D. W., & Healy, H. (2006). Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(12), 3377-3388.
- Muñoz, D., Trujillo, L., Gotuzzo, E., Nizama, M., & Watts, D. (1997). Prácticas sexuales de riesgo y seroprevalencia de infección por VIH-1. HTLV-1, sífilis y hepatitis B en varones drogadictos no endovenosos de Lima. *Revista Medica Herediana*, 8(3), 92-103.
- Nagai, M., Brennan, M. B., Sakai, J. A., Mora, C. A., & Jacobson, S. (2001). CD8+ T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood*, 98(6), 1858-1861.
- Nozuma, S., Matsuura, E., Kodama, D., Tashiro, Y., Matsuzaki, T., Kubota, R., ... & Takashima, H. (2017). Effects of host restriction factors and the HTLV-1 subtype on susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*, 14(1), 26.



- Ohtsuki, Y., Akagi, T., Takahashi, K., & Miyoshi, I. (1982). Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Archives of virology*, 73(1), 69-73.
- Orland, J. R., Engstrom, J., Friley, J., Sacher, R. A., Smith, J. W., Nass, C., ... & Murphy, E. L. (2003). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology*, 61(11), 1588-1594.
- Osame, M., Janssen, R., Kubota, H., Nishitani, H., Igata, A., Nagataki, S., ... & Kaplan, J. (1990). Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: Association with blood transfusion. *Annals of neurology*, 28(1), 50-56.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853.
- Pedral-Sampaio, D. B., Martins, E. N., Pedrosa, C., Brites, C., Duarte, M., & Harrington, J. W. (1997). Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 1(1), 31-35.
- Peng, Y., Power, M. R., Li, B., & Lin, T. J. (2005). Inhibition of IKK down-regulates antigen+ IgE-induced TNF production by mast cells: a role for the IKK-I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B pathway in IgE-dependent mast cell activation. *Journal of leukocyte biology*, 77(6), 975-983.
- Poesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., & Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7415-7419.
- Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B. F., Catalan-Soares, B. C., & Murphy, E. L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, 24(39), 6058.



- Schreck, R. M. B. M., Meier, B., Männel, D. N., Dröge, W., & Baeuerle, P. A. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *Journal of Experimental Medicine*, 175(5), 1181-1194.
- Scowden, E. B., Schaffner, W., & Stone, W. J. (1978). Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. *Medicine*, 57(6), 527-544.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., & Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, 80(12), 3618-3622.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., & Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259(5103), 1912-1915.
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell research*, 21(1), 71.
- Tahata, S., Yuan, B., Kikuchi, H., Takagi, N., Hirano, T., & Toyoda, H. (2014). Cytotoxic effects of pyrrolidine dithiocarbamate in small-cell lung cancer cells, alone and in combination with cisplatin. *International journal of oncology*, 45(4), 1749-1759.
- Tajima, K., T-and B-Cell Malignancy Study Group, & Co-Authors. (1990). The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. *International journal of cancer*, 45(2), 237-243.
- Talledo, M., López, G., Huyghe, J. R., Verdonck, K., Adaui, V., González, E., ... & Van Laer, L. (2010). Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *Journal of medical virology*, 82(3), 460-466.

- Talledo, M., López, G., Huyghe, J. R., Verdonck, K., González, E., Clark, D., ... & Van Laer, L. (2012). Possible implication of NFKB1A and NKG2D genes in susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian patients infected with HTLV-1. *Journal of medical virology*, 84(2), 319-326.
- Talledo, M. & Arévalo, J. (2014). Determinación de los perfiles de expresión de ARNm de la vía de señalización NF-κB en pacientes con paraparesia espástica tropical y pacientes asintomáticos HTLV-1 positivos. Tesis de maestría. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
- Toro, C., Rodés, B., Poveda, E., & Soriano, V. (2003). Rapid development of subacute myelopathy in three organ transplant recipients after transmission of human T-cell lymphotropic virus type I from a single donor. *Transplantation*, 75(1), 102-104.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., & Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50(3), 481-492.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A. M., Vanham, G., & Gotuzzo, E. (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet infectious diseases*, 7(4), 266-281.
- Wan, D., Wu, Q., Qu, W., Liu, G., & Wang, X. (2018). Pyrrolidine Dithiocarbamate (PDTC) Inhibits DON-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis via the NF-κB/iNOS Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M., & Sun, S. C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-κB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKα. *The EMBO journal*, 20(23), 6805-6815.

- Yamaguchi, K., Nishimura, H., Kohrogi, H., Jono, M., Miyamoto, Y., & Takatsuki, K. (1983). A proposal for smoldering adult T-cell leukemia: a clinicopathologic study of five cases. *Blood*, 62(4), 758-766.
- Yamamoto, Y., & Gaynor, R. B. (2004). I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in biochemical sciences*, 29(2), 72-79.
- Zhang, J. J., Xu, Z. M., Zhang, C. M., Dai, H. Y., Ji, X. Q., Wang, X. F., & Li, C. (2010). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor- $\kappa$ B pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells. *Molecular human reproduction*, 17(3), 175-181.

## IX. ANEXOS

### ANEXO I: CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ÉTICA

 <div><b>UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA</b> Vicerrectorado de Investigación Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT)</div>	
<b>CONSTANCIA 634 - 21 - 17</b>	
<p>El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue <b>APROBADO</b> por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión <b>EXENTO</b>. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.</p>	
Título del Proyecto	: "Impacto del tratamiento con PDTC sobre la proteína Ikb $\alpha$ en células de pacientes con PET".
Código de inscripción	: 101559
Investigador principal	: Merino Rojas, Ricardo Jean Pierre
<p>La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:</p> <p><b>1. Protocolo de investigación</b>, versión recibida en fecha 09 de octubre del 2017.</p> <p>La <b>APROBACIÓN</b> considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.</p> <p>Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de <b>EXENTO</b> es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el <b>09 de octubre del 2022</b>.</p> <p>Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.</p> <p><b>Lima, 10 de octubre del 2017.</b></p>	
<div><div><b>Dra. Frine Samalvides Cuba</b> Presidenta Comité Institucional de Ética en Investigación</div></div> <div></div>	

1/850

## **ANEXO II: CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO**

### **1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Individuos de 18 a 60 años de edad que firmen el consentimiento informado para el uso de sus muestras en el presente estudio (Anexo III).
- Individuos HTLV-1 positivos, determinados por ELISA y PCR, con diagnóstico de mielopatía dictaminada en el IMTA<sub>VH</sub>.
- Individuos HTLV-1 positivos, que no hayan recibido tratamiento para la enfermedad.
- Individuos HTLV-1 positivos, que presenten una escala de kurtzke entre 0 a 5.

### **2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con diagnóstico de infección por HTLV-1 indeterminado o negativo.
- Pacientes del cual se registró tuberculosis activa durante las fechas de la toma de muestra.
- Pacientes HTLV-1 positivos, con co-infecciones por *Strongyloides stercoralis* o escabiosis, HIV, Sifilis.
- Enfermedades crónicas debilitantes (Diabetes mellitus, Enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad autoinmune).
- Infecciones concomitantes (HIV, hepatitis viral crónica B o C, tuberculosis, HTLV-2).
- Pacientes con enfermedades inflamatorias conocidas, como: Síndrome de Sjögren, Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Ojo seco, Tiroiditis de Hashimoto.
- Pacientes con Dermatitis Infecciosa, Tuberculosis, artritis reumatoide activa.

## ANEXO III: CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO EN EL PROYECTO

Versión 2. 15/03/2017

### ANEXO 2

#### MODULACIÓN DE LA VÍA DE NF-KB EN CÉLULAS DE PACIENTES INFECTADOS POR HTLV-1 COMO BLANCO PARA EL TRATAMIENTO DE PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL Consentimiento informado

##### Introducción

Invitamos a Ud. a participar en el proyecto "MODULACIÓN DE LA VÍA DE NF-KB EN CÉLULAS DE PACIENTES INFECTADOS POR HTLV-1 COMO BLANCO PARA EL TRATAMIENTO DE PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL". Este proyecto es desarrollado por el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

En las siguientes secciones describiremos el estudio para que pueda decidir voluntaria y de manera informada, o por la persona de la cual es tutor legal, si acepta o no participar. Por favor, revíselas cuidadosamente. La persona que le entregó este documento está también para responder cualquier pregunta que usted tenga. **Muchas gracias por su tiempo.**

##### Objetivo del estudio

Nos interesa comprender mejor porqué solo algunas personas que tienen infección por HTLV-1 desarrollan ciertas enfermedades. A futuro, esto podría ayudar a identificar tempranamente a las personas que tienen mayor riesgo para ello. Por este motivo, necesitamos estudiar alrededor de 16 personas con y 5 sin enfermedades relacionadas con HTLV-1:

- a) actividad inflamatoria, es decir relacionados con la respuesta de defensa generada dentro del organismo ante la infección por HTLV-1;
- b) el efecto de drogas antiinflamatorias, que puedan disminuir la actividad inflamatoria ocasionada por la infección por HTLV-1;
- c) factores genéticos del hospedero, que son aquellos heredados por la persona que tiene la infección
- d) factores virológicos, por ejemplo la cantidad de HTLV-1 en las células sanguíneas, lo cual se determina con una prueba llamada carga proviral.

##### Procedimientos del estudio

Sí usted o la persona de la cual es tutor legal aceptan participar, solicitamos su autorización para **revisar y emplear confidencialmente la información de su historia clínica** y a su vez, realizarle otras evaluaciones o exámenes descritos más adelante.



**APROBADO**

F. APROBACIÓN: 28/03/17



Se hará **un cuestionario general** sobre síntomas de varias enfermedades asociadas con HTLV-1 y **un examen físico**. Adicionalmente, en caso se requiera se solicitarán algunos **exámenes** de rutina que podrían ser indicados por el médico, por ejemplo: hemograma (examen de rutina que permite ver las células sanguíneas), examen de heces (descartar la presencia de algunos parásitos), prueba de PPD (indica posible infección por tuberculosis) y un test de Schirmer (para descartar problemas de ojo seco). Se tomará también **una muestra de sangre** de 18 cc (aproximadamente 6 cucharaditas de té), la cual servirá para realizar el hemograma, la medición de la carga proviral y las pruebas genéticas e inmunológicas.

**El cuestionario, el examen físico y las pruebas de rutina podrían repetirse una vez al año durante los dos años que dure el estudio. Si usted o la persona de la cual es tutor legal fuera un candidato para este estudio** requeriremos **una muestra de sangre adicional**, igual a la primera, que será tomada durante el primer año.

Ante la posibilidad que los resultados obtenidos con esta investigación planteen la necesidad de realizar otros estudios complementarios futuros, requerimos su autorización para mantener almacenada parte de la(s) muestra(s) de sangre. En tal caso, se solicitará primero la opinión de un Comité de Ética independiente, institución encargada de vigilar que se respeten los derechos de las personas que participan en proyectos de investigación. **Todas las muestras que usted o la persona de la cual es tutor legal nos proporcionen serán empleadas exclusivamente con fines de investigación y en ningún caso serán comercializadas.**

#### Riesgos e incomodidades

La participación en este estudio no supone riesgos para su salud, aunque la obtención de la(s) muestra(s) de sangre podría generar ciertas molestias transitorias, como dolor en la zona de la punción, ligera hinchazón o un moretón. Algunas preguntas sobre su estado de salud podrían provocar cierta incomodidad. Para evitar estos inconvenientes, los procedimientos serán realizados por personal con experiencia.

#### Beneficios

Al participar se obtendrán gratuitamente los resultados de los exámenes de laboratorio de rutina (como el hemograma y el examen de heces), los cuales serán potencialmente útiles para la atención de salud. **Los resultados de las pruebas genéticas, inmunológicas y virológicas en este momento no brindan información útil para el cuidado médico suyo o de la persona de la cual es tutor legal**, excepto contribuir a entender mejor cómo se desarrollan ciertas enfermedades relacionadas con la infección por HTLV- 1, **por lo cual no le serán entregados ni a usted**



**APROBADO**

F. APROBACIÓN: 15/03/17



ni a su médico tratante.

#### Confidencialidad

La información clínica y de laboratorio recolectada durante este estudio será mantenida en forma confidencial en el grado permitido por ley. Sin embargo, su médico, las autoridades del Hospital Nacional Cayetano Heredia, los investigadores, los miembros del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia podrían estar en capacidad de revisar sus registros médicos y tener acceso a información confidencial que lo identifique por su nombre.

Los resultados de la investigación, incluyendo resultados de laboratorio, serán incluidos en publicaciones científicas que no revelarán su identidad ni la de los otros participantes.

#### Alternativas

**La decisión de participar es totalmente voluntaria.** Usted o la persona de la cual es tutor legal pueden retirarse en cualquier momento del estudio sin que estas decisiones afecten el cuidado médico recibido en esta institución.

#### Costo de participación

Todos los exámenes y consultas médicas requeridos por este estudio le serán proporcionados gratuitamente. Los costos del cuidado médico habitual y del tratamiento de alguna enfermedad asociada a HTLV-1 que pudiera ser diagnosticada por los exámenes o consultas realizados no serán asumidos por el estudio. Usted o la persona de la cual es tutor legal no recibirán ningún pago por su participación.

#### Preguntas adicionales

Si usted tuviera alguna pregunta sobre este proyecto, puede contactarse con el Dr. Michael Talledo, investigador principal, al número 996288234. Si usted tuviera alguna pregunta sobre sus derechos como participante de este estudio, siéntase libre de contactar a la Dra. Frine Samalvides, Presidente del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, al número 319-0000 anexo 2271 (lunes-viernes, de 9:00am a 4:30 pm).

#### Almacenamiento de muestras

Por favor marque la alternativa con la que está de acuerdo

☐ Acepto que mis muestras sean preservadas para futuras investigaciones en HTLV-1.



**APROBADO**

F. APROBACIÓN: 28/03/17

\_\_\_ No acepto que mis muestras sean preservadas para futuras investigaciones en HTLV-1.

\_\_\_ Espero ser avisado antes de utilizar mis muestras en futuras investigaciones en HTLV-1.

**Firmas**

Con mi firma indico que he aceptado voluntariamente participar en este estudio luego de haber comprendido el objetivo del estudio, los procedimientos involucrados, los riesgos e incomodidades, así como los potenciales beneficios. Entiendo además que los resultados de las pruebas genéticas, virológicas e inmunológicas no me serán informados y he recibido una copia de este documento de \_\_\_ páginas.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o del Tutor Legal

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma de la persona responsable del Consentimiento Informado

\_\_\_\_\_  
Fecha



**APROBADO**

F. APROBACIÓN: \_\_\_\_\_

## **ANEXO IV: PROCEDIMIENTO CRIOPRESERVACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE PBMC**

### **A. Material Biológico**

Se utilizarán células mononucleares de sangre periférica de 16 pacientes con PET confirmado que provendrán del proyecto titulado «Modulación de la vía de NF- $\kappa$ B en células de pacientes infectados por HTLV-1 como blanco para el tratamiento de paraparesia espástica tropical», con código SIDISI 67039 y que hayan firmado el consentimiento informado revisado y aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con código de Constancia 170-07-17 (Anexo 1).

#### **a. Aislamiento de las PBMC**

Las células fueron extraídas por el método de gradiente de Ficoll. Se separó los eritrocitos y plaquetas. Las PBMC serán criopreservadas en 10% de DMSO hasta su procesamiento.

#### **b. Cultivos celulares**

Los cultivos se realizarán en placas de 96 pozos, donde se colocarán 250 000 células por pozo con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina y 0.1% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

### **B. Reactivos y Soluciones**

Polvo de medio RPMI 1640 con L- Glutamina, HEPES 25mM sin bicarbonato de Sodio (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany), solución antibióticos 100X de Penicilina 100 UI/mL & Estreptomicina 100  $\mu$ g/mL (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), polvo de bicarbonato de sodio grado biología molecular (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany), Suero Fetal Bovino procedente de USA, inactivado, estéril para cultivos celulares (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany), solución de L-Glutamina a 200mM, estéril para cultivos celulares (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany), solución de Azul de Tripan al 0.4 % estéril para cultivos celulares (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany).

#### **a. Medio de Cultivo RPMI 1640 incompleto**

Se disolvió RPMI 1640 en 700 mL de agua apirógena. Se aseguró una completa disolución empleando por 20 min un agitador magnético D0400 (Labnet, USA). Se adicionó los siguientes componentes:

**Tabla 2. Formulación medio RPMI 1640 incompleto**

<b>Componente</b>	<b>Para 1 litro</b>
Medio cultivo RPMI 1640	16.4 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g
Antibióticos 100X de Penicilina 100 UI/mL & Estreptomicina 100 µg/mL	10 mL
Agua apirógena c.s.p.	1000 mL

Se ajustó el pH a 7.4 y se filtró en un sistema de filtración Stericup HV con membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) de 0.45 µm de tamaño de poro. Se almacenó a 4 °C.

#### **b. Medio de Cultivo RPMI 1640 completo**

Se suplementó el medio RPMI 1640 incompleto con L-glutamina a una concentración final de 2 mM y con Suero Fetal Bovino inactivado hasta un 10 % del volumen final. No se almacenó a 4 °C.

Solo después de que las células hayan alcanzado la temperatura ambiente se retiró la solución criogénica agitando en un baño maría a 37 °C hasta que desaparezcan los cristales. Se pasó la suspensión de PBMC a un tubo cónico y se le adicionó 10 mL de medio RPMI incompleto. Se centrifugó a 500 g por 15 min. Luego de descartar el sobrenadante se volvió a lavar el pellet, resuspendiendo las células despacio. Finalizado el lavado se resuspendió las células en 1000 µL de RPMI completo. Todas las muestras de PBMC fueron procesadas manteniendo las características clínicas en “ciego”.

## ANEXO V: PROCEDIMIENTO PARA ESTIMAR PROLIFERACIÓN CELULAR

### 1. Reactivos y Soluciones

- Se empleó el trazador comercial CFSE (*CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit*) (Figuras 17 y 18 y Anexo VI).
- *Buffer* de tinción 1X  
Se diluyó 1/10 el Buffer PBS 10X en agua desionizada. Se homogenizó y se adicionó y se adicionó suero bovino fetal inactivado hasta un 10 % del volumen final. Se conservó a 4 °C.

### 2. Metodología

- Tinción de PBMC

Se expuso las células con 2 µM de CFSE (Anexo VI) y se dejó en cultivo por 72 horas. Posteriormente, se retiraron las células en tubos de poliestireno 12x75 mm protegidos de la luz y se realizaron lavados con solución de tinción y centrifugación a 500 g por 10 min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se añadió 200 µL de *buffer* de tinción.

- Adquisición en Citómetro de flujo

Se adicionó 200 µL de buffer de ensayo 1X, se homogenizó. Se configuró un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) con un láser de ion argón (azul 488 nm) y detectores FL para fluorescencia emitida a 530 nm (FL1). Se enlazó el citómetro de flujo al software *Cell Quest*.

Se aseguró que las poblaciones celulares estén visibles en el gráfico *dot plot* entre el *Forward Scatter* (FSC, por su sigla en inglés) versus el *Side Scatter* (SSC, por su sigla en inglés). Seguidamente se posicionó la población en la parte derecha de la ventana a una emisión de voltaje para la Isotiocianato de fluoresceína (FITC, por su sigla en inglés), en el canal FL1 (530/32). Se designó la adquisición de 15000 eventos y se inició la adquisición de las muestras.

## CFSE

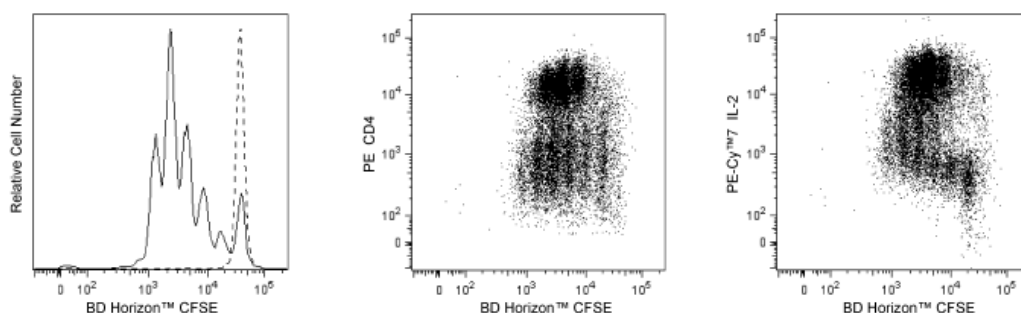
### Product Information

Material Number: 565082  
Size: 1 mg

### Description

BD Horizon™ CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) is a blue laser excitable dye that can be used for flow cytometric monitoring of cell divisions. The non-fluorescent dye passively diffuses across cell membranes and is cleaved by intracellular esterases within viable cells. The cleaved dye becomes highly fluorescent and covalently binds to protein amine groups within the cells via its succinimidyl ester group. Nonviable cells remain nonfluorescent. As viable cells divide, CFSE dye is distributed uniformly between daughter cells; each daughter cell retains approximately half of the CFSE fluorescence intensity of its parent cell. The covalently bound dye is well retained within the cells allowing for applications involving live or aldehyde-fixed and permeabilized cells.

BD Horizon™ CFSE has an excitation maximum of 490 nm and an emission maximum of 520 nm.



**Flow cytometric analysis of proliferating peripheral blood lymphocytes stained with BD Horizon™ CFSE.** Human PBMC were labeled (10 min, 37°C) with BD Horizon™ CFSE (Cat. No. 565082; 2.5 µM). Cells were washed twice and cultured (4 days) alone (dashed line histogram) or with (solid line histogram) phytohemagglutinin. The cells were stained with 0.1 µg/mL DAPI (Cat. No. 564907) to exclude nonviable cells. The histogram shows CFSE fluorescence peaks of gated events with the light-scatter characteristics of viable lymphocytes (DAPI-negative). Unstimulated cells show a single, bright CFSE fluorescence peak, indicating no proliferation. Stimulated cells show multiple CFSE fluorescence peaks, indicating multiple generations of proliferating cells. Analysis was performed using a BD LSRFortessa™ Cell Analyzer System.

**Two-color flow cytometric analysis of proliferating mouse splenocytes stained with BD Horizon™ CFSE.** BALB/c mouse spleen cells were treated with BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer (Cat. No. 555899) to lyse erythrocytes. The splenic leucocytes were washed and labeled with BD Horizon™ CFSE (1 µM) for 10 minutes at 37°C. The cells were washed twice and then cultured with Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD3e (Cat. No. 553057) and Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD28 (Cat. No. 553294) antibodies. After 3 days, the cells were harvested, washed, and restimulated (4 hrs) with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate and Ionomycin in the presence of BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (containing Monensin) (Cat. No. 554724). Cells were harvested, stained with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 (Cat. No. 564405; to exclude nonviable cells), fixed, permeabilized using a BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (Cat. No. 554714), and then stained with PE Anti-Mouse CD4 (Cat. No. 553048/553049/561837) and PE-Cy™7 Anti-Mouse IL-2 (Cat. No. 560538) antibodies. Two-color flow cytometric dot plots showing the correlated expression patterns of CFSE versus CD4 (Left Panel) or IL-2 (Right Panel) were derived from gated events with the forward and side light-scatter characteristics of viable lymphocytes. Flow cytometric analysis was performed using a BD LSRFortessa™ Cell Analyzer System.

**Figura 17. Brochure del kit de CFSE utilizado para la estimación de proliferación celular.** En esta sección se muestran los posibles resultados que se obtendrían al utilizar el kit de estimación de proliferación.



#### Recommended Assay Procedure:

##### Materials Provided

CFSE dye (2 vials, 500 µg dye per vial)

##### Materials needed but not provided

- Viable single-cell suspensions of primary lymphoid cells of interest
- Fresh cell culture-grade Dimethyl Sulfoxide (DMSO; eg, Sigma D2650)
- Sterile Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1× DPBS)
- Cell culture medium, eg, with 10% Fetal Bovine Serum (FBS)
- Sterile polypropylene 15-mL or 50-mL conical tubes
- Microcentrifuge tubes or 2-mL cryovials
- Fluorescent antibodies for immunophenotypic or functional analysis (optional)

##### Required Equipment

- Blue laser-equipped cytometer; eg, BD FACSCanto™ II, BD LSRFortessa™, BD LSR™ II Flow Cytometer, or BD Accuri™ C6
- Centrifuge
- 37°C CO2 Incubator and 37°C Water Bath

##### Storage

Upon arrival, store the dye powder with desiccant and protected from light at ≤ -20°C until use. After reconstitution with DMSO, store the stock solution with desiccant at ≤ -20°C in small aliquots. The stock solution is stable for 3 months if stored as indicated.

##### Procedure

CFSE has a maximum absorption of 490 nm and a maximum emission of 520 nm. Before staining with this reagent, please confirm that your flow cytometer is capable of exciting the fluorochrome and discriminating the emitted fluorescence.

##### Preparation of CFSE dye solution in DMSO

1. Prepare a 10 mM stock solution of CFSE dye by adding 90 µL DMSO to one vial of CFSE. Mix thoroughly by vortexing.
2. Prepare single-use aliquots of the CFSE stock solution (user-defined volume) using appropriately labeled microcentrifuge tubes or 2-mL cryovials.
3. Freeze all aliquots at ≤ -20°C with desiccant and protected from light.

##### CFSE labeling of cells

This procedure has been optimized for labeling mouse and human lymphocytes at cell concentrations of  $10\text{--}30 \times 10^6$  cells/mL. Assay conditions may need to be optimized for other cell types or cell densities.

1. Thaw the 10 mM stock solution of CFSE, if previously frozen.
2. Transfer cells to 15- or 50-mL polypropylene centrifuge tubes.
3. Wash cells in 1× DPBS to remove any residual serum proteins.
4. Repeat step 3.
5. Resuspend the cells thoroughly into a single cell suspension at a concentration of  $10\text{--}30 \times 10^6$  cells/mL in 1× DPBS.
  - a. Note: Avoid staining in azide-, serum-, or protein-containing buffers, as these moieties bind free dye and may interfere with staining of the cells.
6. Add stock CFSE to the single cell suspension to achieve a final concentration of 1–10 µM. If necessary, the stock solution may be diluted further with DMSO before addition to the single cell suspension. Vortex immediately.
7. Incubate the dye-cell suspension in a 37°C water bath for 10–15 minutes.
8. Add 9× the original volume of 1× DPBS to the cells and pellet cells by centrifugation.
9. Decant the supernatant and gently mix to disrupt the cell pellet.
10. Add 10 mL of complete medium with 10% FBS and repeat centrifugation step.
11. Decant supernatant and gently mix to disrupt the cell pellet.
12. Resuspend the cells in complete medium and proceed to cell culture or analysis by flow cytometry.

##### Notes:

1. Confirm brightness of the cell labeling by comparing labeled cells with unlabeled control cells.
2. BD Horizon™ CFSE can be used in intracellular staining assays that require fixation with formaldehyde and permeabilization with methanol and detergents such as those used for BD Phosflow™ staining (eg, Cat. No. 558050, BD Phosflow™ Perm Buffer III), intracellular cytokine staining (eg, Cat. No. 554714, BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit), or transcription factor staining (eg, Cat. No. 562574/562725, BD Pharmingen™ Transcription Factor Buffer Set).
3. Higher initial staining intensities can be achieved by increasing the initial CFSE dye loading concentration. However, as with other succinimidyl ester containing tracking dyes, higher loading concentrations may lead to increased cell toxicity or cell death.

**Figura 18. Brochure del kit de CFSE utilizado para la estimación de proliferación celular.**

En esta sección se ubica el procedimiento recomendado por el kit para la correcta realización del experimento, la traducción de esta sección se encuentra en el Anexo VI.

## **ANEXO VI: PROCEDIMIENTO DE ENSAYO RECOMENDADO POR EL KIT CFSE**

### **Traducido del *brochure* del kit de CFSE**

#### **Materiales proporcionados**

CFSE (2 viales, 500 µg de tinte por vial)

#### **Materiales necesarios, pero no proporcionados**

- Suspensiones celulares de interés.
- Dimetilsulfóxido de grado de cultivo celular fresco
- Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco estéril (1X DPBS)
- Medio de cultivo celular
- Tubos cónicos de polipropileno estéril de 15 ml o 50 ml.
- Tubos de microcentrifuga o crio viales de 2 ml.
- Anticuerpos fluorescentes para análisis inmunofenotípicos o funcionales (opcional)

#### **Equipo requerido**

- Citómetro equipado con láser azul; por ejemplo, BD FACSCanto™ II, BD LSRFortessa™, citómetro de flujo BD LSR™ II o BD Accuri™ C6
- centrifugadora
- Incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C y baño de agua a 37 °C

#### **Almacenamiento**

A su llegada, almacene el producto con desecante y protegido de la luz a  $\leq -20$  °C hasta su uso. Después de la reconstituir con DMSO, almacene la solución stock con desecante a  $\leq -20$  °C en pequeñas alícuotas. La solución madre es estable durante 3 meses si se almacena como se indica.

#### **Procedimiento**

CFSE tiene una absorción máxima de 490 nm y una emisión máxima de 520 nm. Antes de teñir con este reactivo, confirme que su citómetro de flujo es capaz de excitar el fluorocromo y discriminar la fluorescencia emitida.

#### **Preparación de la solución de colorante CFSE en DMSO**

1. Prepare una solución madre de 10 mM de CFSE agregando 90 µL de DMSO a un vial de CFSE. Mezclar bien con vórtex.



2. Prepare alícuotas de un solo uso de la solución madre de CFSE (volumen definido por el usuario) utilizando tubos de microcentrífuga debidamente etiquetados o crioviales de 2 ml.
3. Congele todas las alícuotas a  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  con desecante y proteja de la luz.

### **Tinción de las células con CFSE**

Este procedimiento se ha optimizado para marcar linfocitos humanos y de ratón a concentraciones celulares de  $10\text{-}30 \times 10^6$  células/ml. Las condiciones de ensayo podrían optimizarse para otros tipos de células u otras densidades celulares.

1. Descongelar la solución madre de 10 mM de CFSE, si se ha congelado previamente.
2. Transferir las células a tubos de centrifuga de polipropileno de 15 o 50 ml.
3. Lavar las células en 1X DPBS para eliminar las proteínas séricas residuales.
4. Repetir el paso 3.
5. Resuspender las células a fondo en una suspensión de células individuales a una concentración de  $10\text{-}30 \times 10^6$  células / ml en  $1 \times$  DPBS.

Nota: Evite la tinción en *buffers* que contengan azida, suero o proteínas, ya que estos restos se unen al CFSE libre y pueden interferir con la tinción de las células.

6. Agregar CFSE a la suspensión de células individuales para lograr una concentración final de  $1\text{-}10\text{ }\mu\text{M}$ . Si es necesario, la solución madre puede ser diluida adicionalmente con DMSO antes de la adición a la suspensión de células individuales. Vórtex de inmediato.
7. Incubar la suspensión de células de colorante en un baño de agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10-15 minutos.
8. Agregar  $9 \times$  el volumen original de 1X DPBS a las células y a las células granuladas por centrifugación.
9. Decantar el sobrenadante y mezclar suavemente para romper el sedimento celular.
10. Agregar 10 ml de medio completo con FBS al 10% y repita el paso de centrifugación.
11. Decantar el sobrenadante y mezclar suavemente para romper el sedimento celular.
12. Resuspender las células en medio completo y proceder al cultivo celular o al análisis por citometría de flujo.

Notas:

1. Confirme la señal de tinción de las células comparando las células teñidas con células control sin tinción.
2. BD Horizon <sup>™</sup> CFSE puede usarse en ensayos de tinción intracelular que requieren fijación con formaldehído y permeabilización con metanol y detergentes, tinción intracelular de citoquinas, o tinción de factores de transcripción.
3. Se pueden lograr intensidades de tinción iniciales más altas aumentando la concentración inicial de CFSE. Sin embargo, como con otros esteres de succinimidil éster que contiene colorantes de rastreo, las concentraciones de carga más altas pueden conducir a una mayor toxicidad celular o muerte celular.

## **ANEXO VII: PROCEDIMIENTO ESTIMACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL NF- $\kappa$ B**

### **A. Separación de fracciones nuclear y citoplasmática**

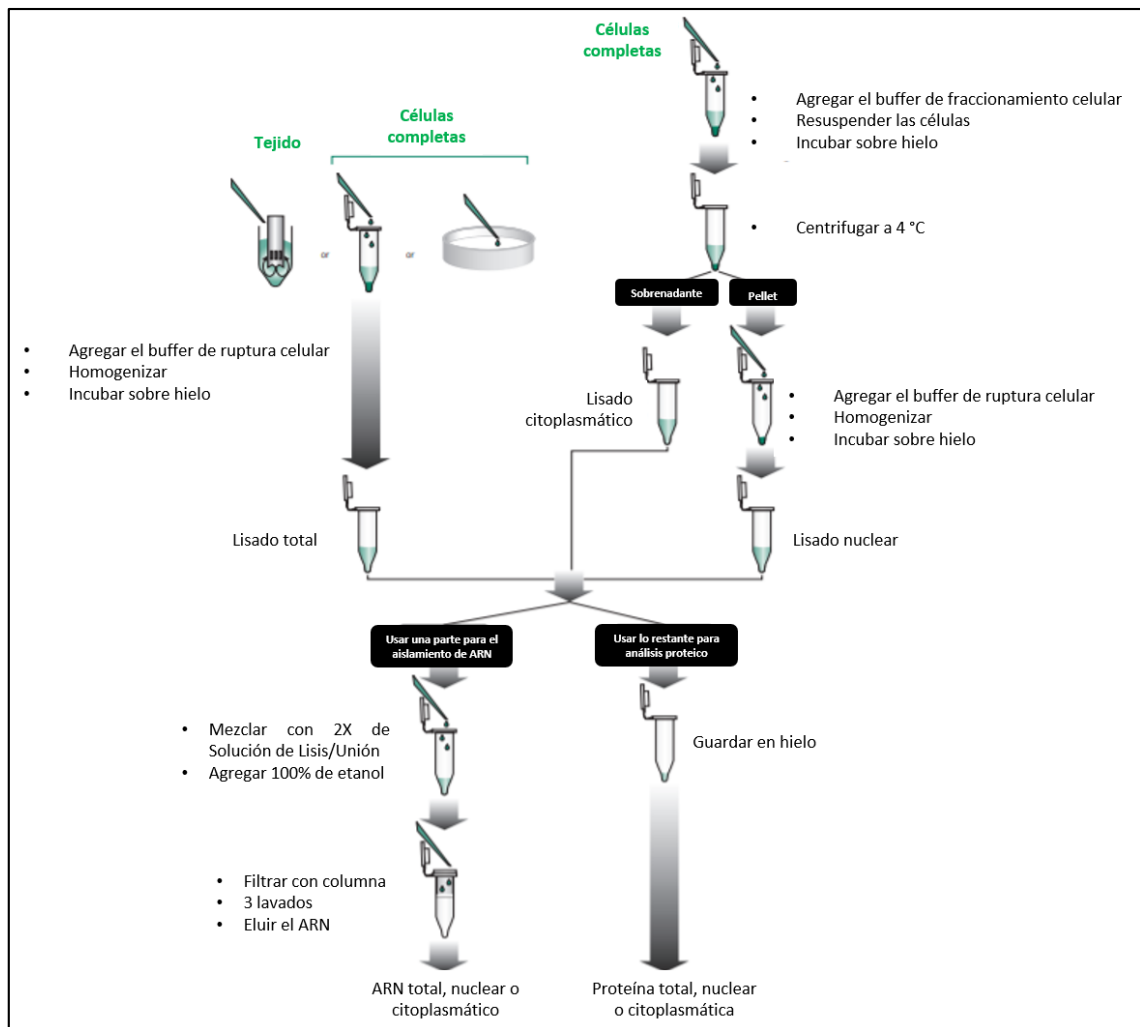
El proceso de separación de fracciones se realizó mediante el kit *Paris*<sup>®</sup> (Ambion, Lituania), a partir del cual se obtuvieron dos fracciones celulares: nuclear y citoplasmática (Figura 19).

### **B. Medición de la traslocación de RelA**

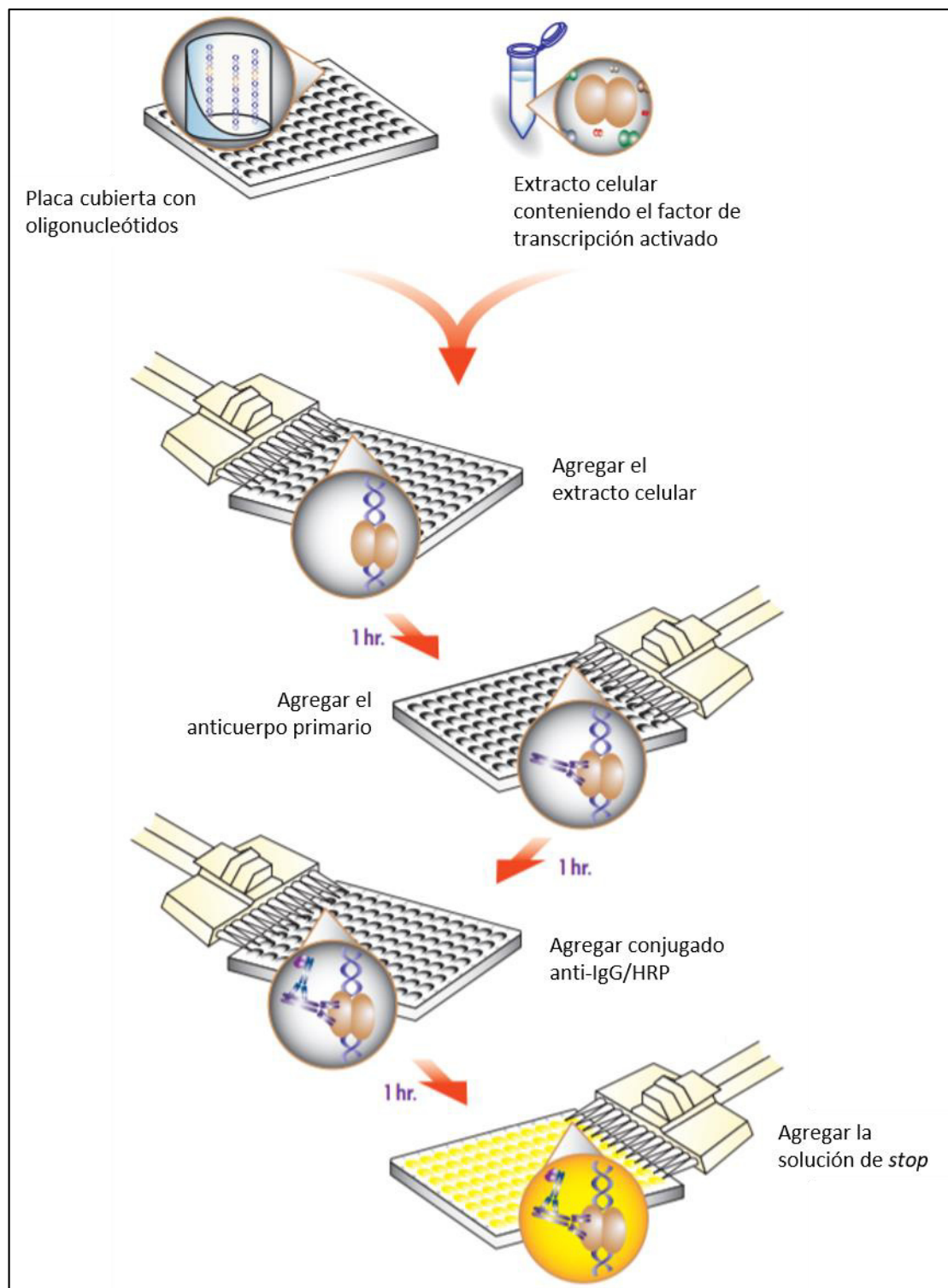
La medición de las cantidades de proteína RelA (p65) se realizó a través del kit TransAM<sup>®</sup> NF $\kappa$ B Family (Active Motif<sup>®</sup>), el cual utiliza un sistema tipo ELISA con placas cubiertas con oligonucleótidos consenso de NF- $\kappa$ B (Figura 20).

### **C. Medición de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ fosforilada**

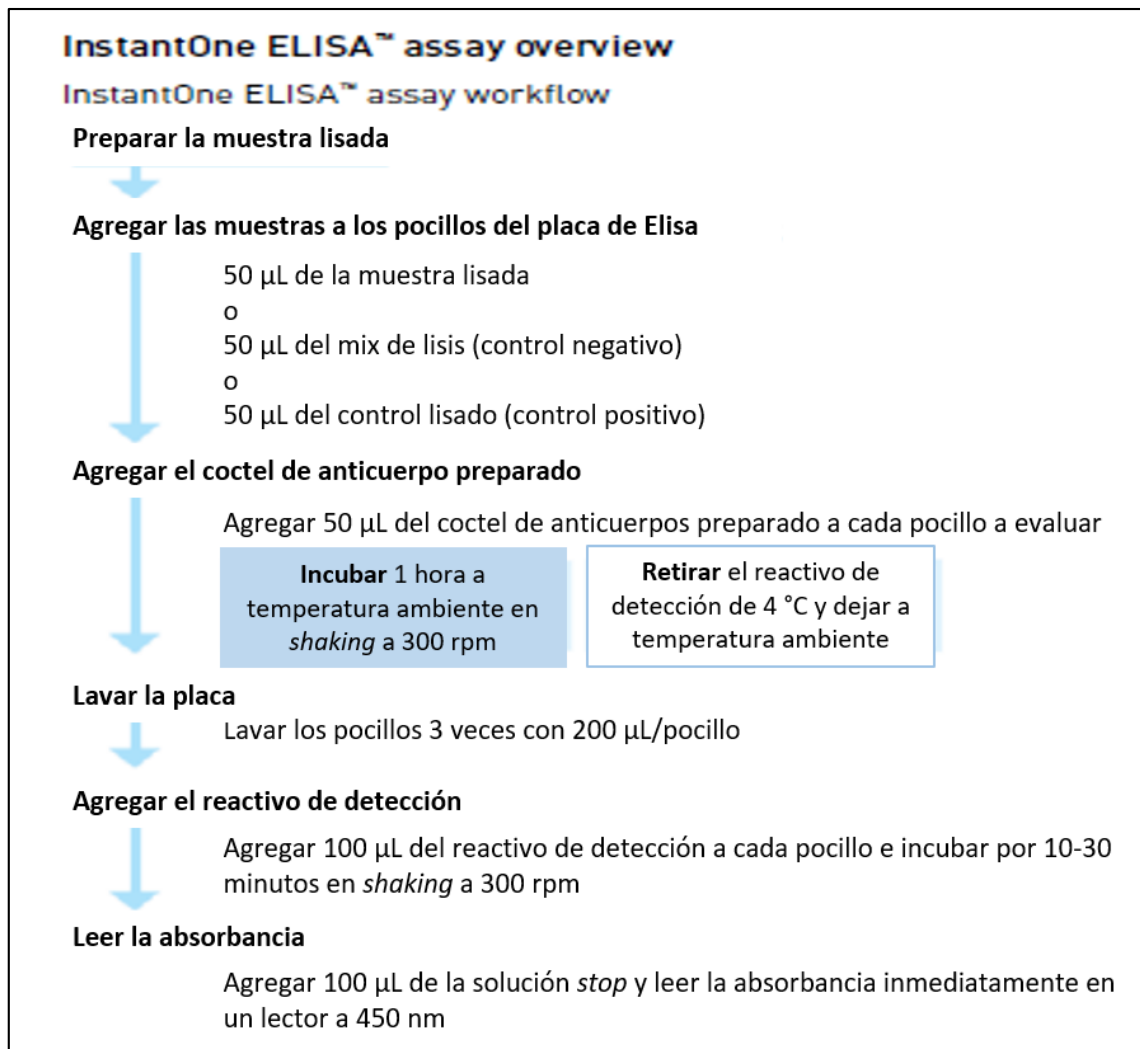
La cuantificación de esta proteína se realizará a partir de la fracción citoplasmática, utilizando el kit *I $\kappa$ B $\alpha$  (Total/Phospho) ELISA* (Invitrogen) que hace uso de anticuerpos primarios dirigidos a fosfoserina32 y fosfoserina36 del I $\kappa$ B $\alpha$  para distinguir entre la proteína los dos tipos de I $\kappa$ B $\alpha$  (fosforilada y no fosforilada) (Figuras 21 y 22).



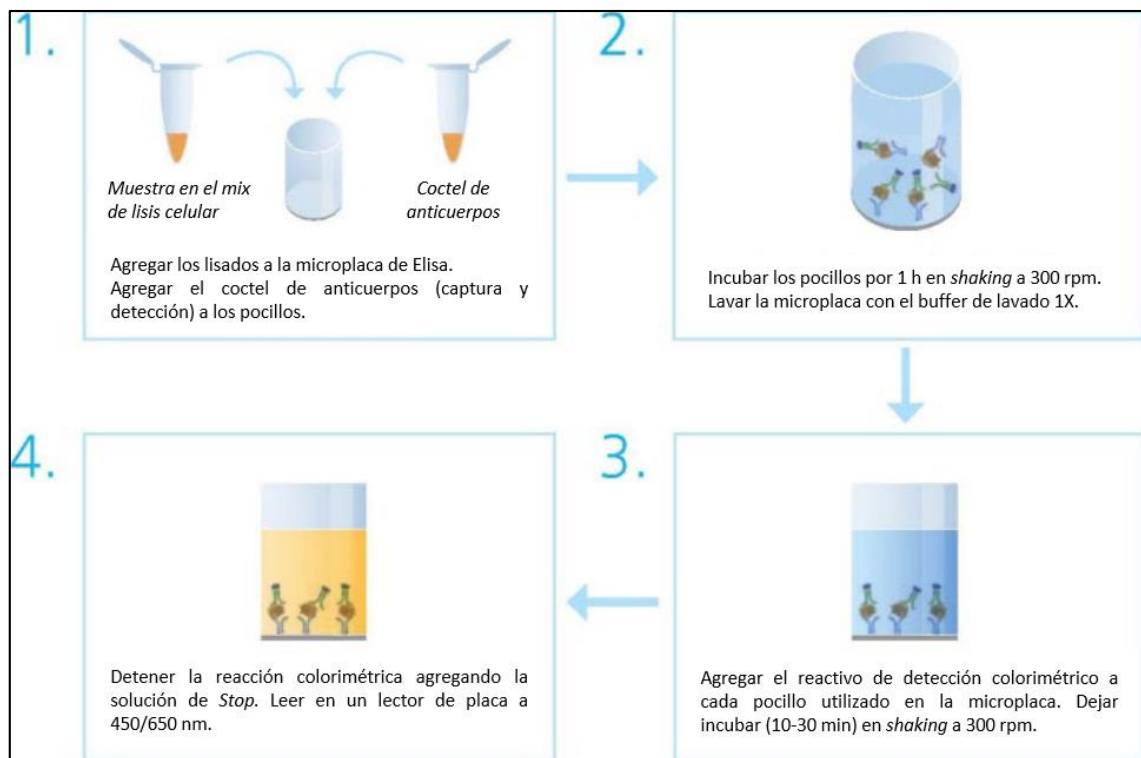
**Figura 19. Resumen del procedimiento de fraccionamiento celular realizado con el kit PARIS.** Los resultados finales del procedimiento con este kit son una fracción nuclear y una fracción citoplasmática. Adaptado del manual del kit Paris® (Ambion, Lituania).



**Figura 20. Resumen esquemático del procedimiento utilizado para la medición de la proteína RelA en la fracción nuclear utilizando el kit TransAM® NFκB Family (Active Motif®).** Traducido y adaptado de la guía del kit de TransAM® NFκB Family (Active Motif®).



**Figura 21. Flujograma esquemático del procedimiento para la medición de la proteína IκBα utilizando el kit IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen).** Traducido y adaptado de la guía del kit de IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen).



**Figura 22. Flujograma esquemático del procedimiento para la medición de la proteína IκBα utilizando el kit IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen).** Traducido y adaptado de la guía del kit de IκBα (Total/Phospho) ELISA (Invitrogen).